

*Tanulj a tegnaptól, élj a mánap és reménykedj a holnapban.
A legfontosabb azonban, hogy ne hagyd abba a kérdezést.*
(A. Einstein)

**A mitokondriális elektrontranszportot befolyásoló Arabidopsis PPR40
fehérje szerepe az abiotikus stresszválaszokban**

Ph.D. értekezés

Zsigmond Laura

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet

Témavezető: Dr. Szabados László

Szeged

2008

Rövidítések jegyzéke

ABS	abszcizinsav
APX	aszorbát peroxidáz
AOX	alternatív oxidáz
ASC	aszorbinsav
ATP	adenozin-trifoszfát
BN-PAGE	"blue-native" poliakrilamid gélelektroforézis
DAB	3,3-diaminobenzidin
DHA	dihidro-aszorbinsav
FADH	flavin-adenin-dinukleotid
FITC	fluoreszcein izotiocianát
GLX	glioxaláz
H ₂ O ₂	hidrogénperoxid
HO ₂ [·]	hidroperoxil gyök
LB	a T-DNS baloldali 25 bp határszekvenciája
MG	metilglioxál
MnSOD	mangánt tartalmazó szuperoxid dizmutáz
MS	Murashige és Skoog által kifejlesztett növényi táptalaj
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
¹ O ₂	szinglet oxigén
[·] O ₂ ⁻	szuperoxid gyökanion
[·] OH	hidroxil gyök
P5CS	Δ ¹ -pirrolin-5-karboxilát szintáz
PDH	prolin dehidrogenáz
PPR	pentatrikopeptid ismétlődés
RB	a T-DNS jobboldali 25 bp határszekvenciája
ROS	reaktív oxigénformák
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SDS-PAGE	nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SOD	szuperoxid dizmutáz
T-DNS	Ti plazmid transzfer-DNS-e

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
Tartalomjegyzék.....	3
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> mint modellnövény.....	7
2.1.1. A T-DNS inszerciós mutagenesis.....	7
2.2. A stressz.....	9
2.2.1. Ozmotikus stressz.....	9
2.2.1.1. Hőmérsékleti stressz.....	10
2.2.1.2. Szárazságstressz.....	11
2.2.1.3. Sóstressz.....	12
2.2.2. Oxidatív stressz.....	12
2.2.2.1. Az oxigén reaktív formái.....	13
2.2.2.2. Enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok.....	14
2.2.2.2.1. Karotinoidok és tokoferolok.....	14
2.2.2.2.2. Szuperoxid-dizmutáz.....	14
2.2.2.2.3. Az aszkorbinsav és az aszkorbát-peroxidáz.....	15
2.2.2.2.4. A glutation, a glutation-reduktáz és a glutation-peroxidáz.....	16
2.2.2.2.5. Kataláz.....	16
2.3. A mitokondrium és szerepe a sejten belüli ROS képződésben.....	16
2.3.1. Energiatermelés és légzés folyamata.....	18
2.3.1.1. Az oxidatív foszforiláció és a terminális oxidáció.....	19
2.3.2. Alternatív légzési utak.....	20
2.4. A PPR fehérjék családja.....	20
3. Célkitűzések.....	23
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1. Kísérleti növények és sejt kultúrák fenntartása és kezelése.....	24
4.1.1. Növények.....	24
4.1.2. Sejt kultúrák.....	25
4.2. A <i>ppr40-1</i> és <i>ppr40-2</i> mutánsok azonosítása és jellemzése.....	25

4.3. Molekuláris biológiai alapszerek, plazmid konstrukciók.....	26
4.3.1. Alapszerek.....	26
4.3.2. Plazmid konstrukciók.....	26
4.4. RNS izolálás és génexpressziós vizsgálatok.....	26
4.5. Northern analízis.....	27
4.6. Bioinformatikai alkalmazások.....	27
4.7. Mitokondrium és kloroplasztisz tisztítás.....	28
4.8. Fehérje izolálás és immunoblot analízis.....	28
4.9. Mitokondriális fehérje komplexek elválasztása cukorgrádiensen.....	29
4.10. Két-dimenziós Blue-Native/SDS gélelektroforézis.....	29
4.11. Fehérjék azonosítása tömegspektroszkópiával.....	30
4.12. Immunfestési eljárások.....	30
4.13. Klorofill-tartalom meghatározása.....	30
4.14. Hidrogén-peroxid kimutatása növényekben.....	31
4.14.1. DAB festés.....	31
4.14.2. H ₂ O ₂ képződés mérése.....	31
4.15. Lipidperoxidáció mérése.....	31
4.16. Prolin-tartalom meghatározása.....	32
4.17. Enzimaktivitások fotometriás mérése.....	32
4.17.1. Aszkorbát peroxidáz aktivitás mérés.....	32
4.17.2. Szuperoxid dizmutáz aktivitás mérés.....	33
4.17.3. Citokróm c oxidáz aktivitás mérés.....	33
4.18. Abszizinsav tartalom meghatározás.....	33
4.19. Sztómazáródási vizsgálat.....	34
4.20. Aszkorbinsav fogyasztás és légzés vizsgálata mitokondriumban.....	34
5. Eredmények.....	36
5.1. A <i>ppr40</i> mutánsok azonosítása.....	36
5.2. <i>ppr40-1</i> mutáns növények fenotípusának jellemzése.....	39
5.3. A <i>ppr40-1</i> mutáns genetikai komplementációja és a transzgenikus T2 nemzedék vizsgálata.....	43
5.4. A PPR40-HA fehérje túltermeltetése vad típusú növényekben.....	46
5.5. A <i>ppr40-1</i> ABS érzékenységeinek következményei.....	47
5.5.1. A PPR40 fehérje befolyásolja a sztómamozgást.....	47
5.5.2. A PPR40 szerepe a stresszindukált jelátviteli utakban.....	49

5.5.3 Prolin felhalmozódás a <i>ppr40-1</i> mutánsban.....	50
5.6. A <i>ppr40-1</i> mutáns toleráns a metilglioxál toxikus hatására.....	52
5.7. A PPR40 fehérje kapcsolata a mitokondriális elektron transzporttal.....	54
5.7.1. A PPR40 fehérje lokalizációja	54
5.7.2. A PPR40 kapcsolódása a III komplexhez	56
5.7.3. A <i>ppr40-1</i> és vad típus mitokondriális komplexeinek összehasonlítása.....	58
5.7.4. A PPR40 lehetséges szerepe a mitokondriális RNS érési folyamataiban.....	60
5.8. A <i>ppr40-1</i> mutánsban sérült a III komplexen keresztüli elektronáramlás	62
5.9. A <i>ppr40-1</i> mutánsban megemelkedett az oxidatív károsodás mértéke.....	65
6. Eredmények megvitatása.....	68
6.1. A <i>ppr40-1</i> mutáció okozta változások a III komplexen keresztül befolyásolják a mitokondriális elektrontranszportot	68
6.2. A <i>ppr40-1</i> mutánsban megemelkedett a ROS mennyisége.....	70
6.3. A <i>ppr40-1</i> mutáció befolyásolja a stresszválaszok szabályozását	71
7. Összefoglalás.....	75
8. Köszönetnyilvánítás.....	76
9. Irodalmi hivatkozások	77
10. Ph. D. thesis.....	87
11. Publikációs lista.....	95
12. Függelékek	96

1. Bevezetés

Mint minden élőlény, a növények is számtalan olyan környezeti hatásnak vannak kitéve, melyek szaporodási és növekedési folyamataikat kedvezőtlenül befolyásolják. Helyhezkött életmódjukból adódóan a környezeti hatásokra folyamatos alkalmazkodással válaszolnak. Az optimális életfeltételektől eltérő hatásokra - stresszhatásokra - a növények védekezési mechanizmusok széles skáláját aktiválják: ilyenek a különböző jelátviteli utak által fokozott vagy csökkentett génkifejeződések és az ebből következő anyagcsere-folyamatok módosításai. A Föld klímaváltozásából és a sokszor helytelen gazdálkodásból fakadóan a mezőgazdaságilag hasznosítható termőterületek folyamatosan csökkennek. A szárazság, az alacsony vagy magas hőmérséklet és a talaj magas sótartalma által kiváltott ozmotikus stressz kutatása ezért napjainkban különös jelentőséggel bír. Az utóbbi években egyre több kísérletes bizonyítékot találtak arra, hogy az ozmotikus stressz esetén kialakuló élettani és biokémiai válaszreakciók nem egy lineáris jelátviteli folyamat eredményeként jönnek létre, hanem egymással kölcsönhatásban lévő szabályozási rendszerek együttes hatásának köszönhetően alakulnak ki.

Munkacsoportunk érdeklődésének középpontjában hosszabb ideje a növényi szárazság és sótűrés szabályozási folyamatainak felderítése állt. A jelátviteli folyamatokban részt vevő gének funkciójának vizsgálatakor jellemzően reverz genetikai módszereket alkalmaztunk. A laboratóriumunkban előállított *Arabidopsis thaliana* T-DNS inszerciós mutáns kollekción (Szabados és mtsai., 2002) felhasználva olyan mutánsokat kerestünk, melyek az ozmotikus stresszválaszban résztvevő géneket érintenek. Az ozmotikus stresszt kiváltó kezelések (magas só koncentráció, dehidratáció) mellett vizsgáltuk a fény, a cukor és több növényi hormon (például ABS és etilén) szabályozó szerepét is a stresszválaszokban. Kísérleteink során több olyan mutánst is sikerült azonosítani, amely megváltozott módon reagált a fent említett stresszhatásokra.

Jelen dolgozatomban egy abszcizinsav érzékeny, kis növésű *Arabidopsis* mutáns részletes jellemzésének az eredményeiről írok, amelyben a mutáció az *At3g16890* gént érintette, ami egy pentatrikopeptid ismétlődő motívumot tartalmazó fehérjét kódol. A vizsgált fehérjéről kimutattuk, hogy jelentős szerepe van a mitokondriális elektrontranszport működésében.

2. Irodalmi áttekintés

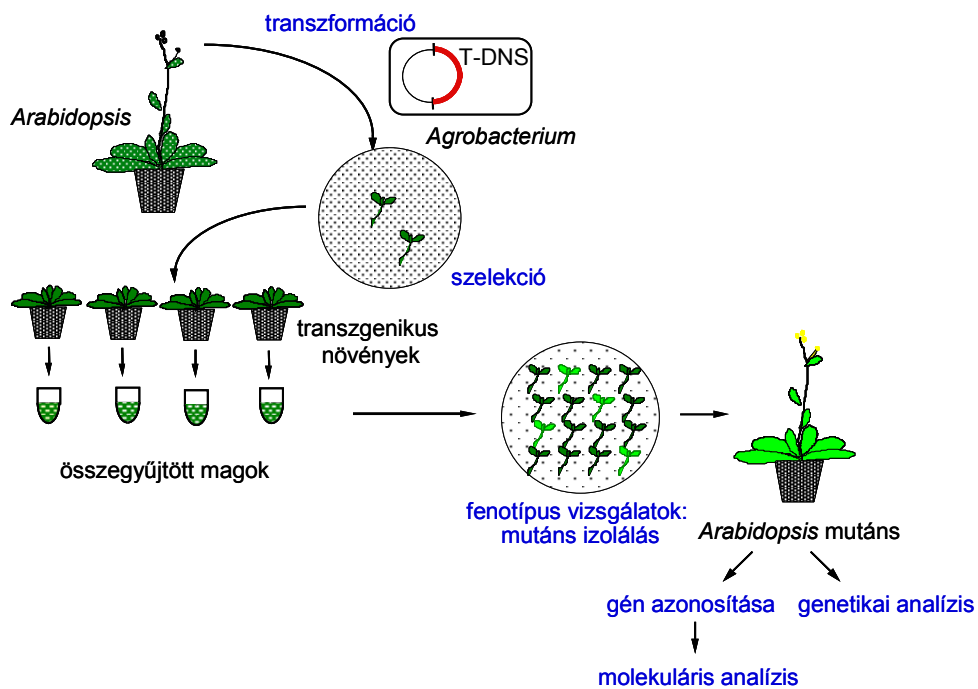
2.1. *Arabidopsis thaliana* mint modellnövény

Arabidopsis thaliana, magyarul lúdfű, a keresztes virágúak családjába tartozik és több előnyös tulajdonsága is alkalmassá teszi arra, hogy a növényi genetikai kutatások egyik modell organizmusa legyen. A kifejlett *Arabidopsis* kis mérete és rövid életciklusa lehetővé teszi nagyobb populációk laboratóriumi vizsgálatát. Diploid, kromoszómaszáma alacsony ($n=5$), és genom mérete (125000 kb) az egyik legkisebb a magasabbrendű növények között. Az *Arabidopsis* genomja viszonylag kevés repetitív DNS-t tartalmaz: a növény össz- (sejtmagi, mitokondriális, kloroplasztisz) DNS-nek 10-14%-a magasan, 23-27%-a közepesen repetitív és 50-55%-a egyedi kópiájú szekvencia (Meyerowitz, 1992). Önbeporzó, könnyen keresztezhető és ideális körülmények között nagy szaporodási hányadossal rendelkezik, egyetlen növény több ezer magot is hozhat. Az *Arabidopsis* kémiai és fizikai mutagénekre is jól reagál, *Agrobacterium*-közvetített növény transzformációval nagyszámú transzformáns növény hozható létre. 2000-ben a magasabbrendű növények közül elsőként fejeződött be a teljes *Arabidopsis* genom nukleotid sorrendjének meghatározása. Az *Arabidopsis*-ből izolált gének bármely növény hasonló génjeinek tanulmányozására felhasználhatók, vagy akár közvetlenül alkalmazhatóak a gyakorlati növény-nemesítésben. Emiatt lehetőség nyílik az *Arabidopsis* modellen végzett növényi molekuláris biológiai alapkutatások eredményeinek viszonylag gyors alkalmazására a mezőgazdaság és az ipar területén.

2.1.1. A T-DNS inszerciós mutagenézis

A növényi gének izolálására és funkcióik vizsgálatára számos lehetőség áll rendelkezésünkre, melyek közül az egyik az *Agrobacterium* közvetített T-DNS inszerciós mutagenézis és az azt követő mutáns analízis (2.1. ábra). A növények *Agrobacterium tumefaciens*-szel történő transzformációja során a T-DNS a növény sejtmagi DNS-be stabilan integrálódik egy nem homológ, úgynevezett illegitim rekombinációs mechanizmussal. A T-DNS-t az *Agrobacterium* Ti (Tumor inducing) plazmidja hordozza, amely tartalmazza még a plazmid fenntartásában, az opinok bioszintézisében, valamint az *Agrobacterium*-ból növénybe

történő DNS átvitelhez szükséges funkciókat kódoló bakteriális géneket (*vir* gének). Kísérleti adatok bizonyítják, hogy a T-DNS elsősorban az átíródó növényi DNS régióba épül be (Koncz és mtsai, 1992; Mathur és mtsai, 1998). Aktív génbe történő T-DNS inszerció az érintett gén inaktiválásával járhat, és gyakran kis deléciókat (4-80 bp), illetve átrendeződéseket eredményezhet. Az egy kópiát hordozó T-DNS inszerciók mellett gyakran előfordulnak több kópiájú összetett T-DNS inszerciók is. A létrejött inszerciók mutáció helye könnyen azonosítható a T-DNS ismert jobb és bal oldali határszekvenciái segítségével. A T-DNS inszerciók felhasználhatók transzkripciós és transzlációs génfüziók, inszerciók mutánsok, valamint genetikai térképezéseket szolgáló domináns markerek előállítására. A T-DNS mutagénként való alkalmazásával nagyszámú transzgenikus növényt állíthatunk elő, és az így létrehozott mutánsok lehetővé teszik a reverz genetikai megközelítést is, amikor egy ismert DNS szekvencia funkcióját keresik, annak mesterséges megváltoztatásával.



2.1. ábra *Arabidopsis thaliana* T-DNS inszerciók létrehozása és jellemzése

2.2. A stressz

A növények, az összes többi élőlényhez hasonlóan, számtalan környezeti hatásnak (szárazság, hőmérséklet-változás, kórokozókkal történő fertőződés, sebzés, erős fény, tápanyaghiány, stb.) vannak kitéve életük során. E hatások gyakran az optimális életkörülményektől kisebb-nagyobb mértékben eltérőek lehetnek (környezeti stressz), ezzel alkalmazkodásra késztetve a helyhez kötött életmódot folytató növényeket. Larcher (1987) a növényekre vonatkozóan következőképpen fogalmazta meg a stressz definícióját: " A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényvel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz. "

A stressztényezőket többféleképpen is csoportosíthatjuk, ebből az egyik szempont szerint megkülönböztetünk abiotikus és biotikus tényezőket. Biotikus stresszt kiválthatják a vírusok, baktériumok, gombák, illetve az állatok által okozott különféle eredetű sebzések. Abiotikus stressztényezők közé tartoznak például a szárazság, sóstressz, hőmérsékleti stressz, illetve az oxidatív stressz. Ezek a tényezők képesek meghatározni a növények egyedfejlődésének különböző folyamatait (Bray és mtsai., 2000). A stresszhatások egymással összefüggésben állnak, és e hatások által kiváltott alkalmazkodási képesség fajonként nagy változatosságot mutat, ami behatárolja a növények elterjedését, túlélési lehetőségét (Smirnov, 1998). Az abiotikus környezet alapvetően meghatározza a mezőgazdaság lehetőségeit, az egyes növényfajok, fajták termesztésének feltételeit is.

2.2.1. Ozmotikus stressz

Az abiotikus stressztényezők közül a szárazság, az alacsony és magas hőmérsékleti stressz és a talaj magas sótartalma egyaránt ozmotikus stressz kialakulásához vezet. Az ilyen típusú károsodás a legfontosabb korlátja a növénytermesztésnek a hideg, száraz éghajlaton, vagy sós, szikes talajokon. Régóta ismert, hogy egyes növények képesek száraz klímához alkalmazkodni, más fajok sós, szikes talajokhoz adaptálódtak sikerrel. Az alkalmazkodás jellegzetes élettani és biokémiai változásokkal jár, amelyek lehetővé teszik, hogy a növények bizonyos mértékig tolerálják a vízvesztést vagy a magas sótartalmat, ami gátolja a vízfelvételt

(Tabaeizadeh, 1998). Ozmotikus stressz hatására a felületi receptorok által érzékelt jelek a sejten belül több útvonalat érintenek. Ennek keretében megemelkedik a sejteken belül a Ca^{2+} , a reaktív oxigén molekulák és az inozitol-foszfátázok szintje. A normál értéknél magasabb Ca^{2+} -szintet intracelluláris Ca^{2+} -kötő fehérjék érzékelik, majd a jel foszforilációs kaszkádokon (MAPK, CDPK) és foszfátázokon keresztül jut a célgénekhez. Shinozaki egy közleményben legalább hatféle szabályozási utat különböztet meg, amelyek az ozmotikus stresszhez való alkalmazkodást segítik elő (Shinozaki, 2000). Ebből két útban a résztvevő gének expressziójának a szabályozása ABS-függő (például *RD29B*, *RD22*), négy ABS-független (például *ERD1*, *COR15A*). Az ABS-független utak közül kettőt az alacsony hőmérséklet is befolyásol. A növény két szakaszban ún. korai, majd az ún. késői gének átírásával válaszol az abiotikus természetű kihívásokra. A korai gének közé tartoznak különböző transzkripciós faktorok (DREB1/CBF, ABRE1-4, MYB, MYC), iontranszporterek (AtHKT1), egyes protein kinázok (pl. II típusú SnRK, SOS2) és foszfátáz (ABI1, ABI2), amelyek ezen utak valamelyikét, illetve a késői válaszokban részt vevő gének átíródását szabályozzák. (Singh és mtsai., 2002, Seki és mtsai., 2003). Az ozmotikus stressz kialakulásakor többféle védő fehérje halmozódik fel: LEA fehérjék (late embryogenesis abundant) melyek a mag kiszáradása előtt termelődnek, detoxifikációban résztvevő enzimek, különféle védő funkciójú metabolit szintéziséért felelős enzimek. A legjellegzetesebb élettani változások közé tartozik az ozmoprotektáns molekulák mint például prolin, glicin-betain, mannitol felhalmozódása, ami csökkenti a vízvesztés káros hatásait (Hare és mtsai., 1998). Az ozmoprotektáns vegyületek védő hatását egyes esetekben transzgenikus növények segítségével is sikerült kimutatni (Chen és Murata, 2002). Az extrém környezethez való alkalmazkodás molekuláris genetikai szabályozásáról egyre több információ áll rendelkezésünkre, de a folyamat egésze egyelőre nem ismert.

2.2.1.1. Hőmérsékleti stressz

A növények számára optimális hőmérsékletet egyes enzimek, például a malátdehidrogenáz és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz Michaelis-konstansának segítségével határozzák meg, és az adott hőmérsékleti tartomány alsó határértéke alatt hidegstresszről, felső értéke felett pedig hőstresszről beszélhetünk.

Az alacsony, de még fagyhatár feletti hőmérséklet esetében az arra érzékeny növényeknél 0 és 15-20 °C között hidegstresszről, míg 0 °C alatt fagystresszről beszélünk. A károsodás mértéke elsősorban a növényi sejtmembránokat alkotó telített és telítetlen zsírsavak egymáshoz viszonyított arányán múlik. A hidegre érzékeny, illetve a fagyérzékeny növények

sejtfalában nagyobb arányban lelhetők fel a telített zsírsavak, mint a telítetlenek. Ennek következménye, hogy ezekben a növényekben a membránok lipid kettős rétege folyadékkristályos állapotból gél állapotba megy át a hőmérséklet csökkenésekor. Ezt követi a membránok különböző mértékű fázisszétválása, amely a szemipermeabilitás megszűnéséhez és a sejtek pusztulásához vezet. Fagyásnál az elsődleges károsító következmény a sejten belüli jégkristályok kialakulása. A fent említett védekező mechanizmusok mellett a hőmérséklet csökkenésének kompenzálására a szénhidrát anyagcsere is módosul. A sejtközi térben megemelkedik a cukrok koncentrációja, így alacsonyabb hőmérsékleten kezdődik el a jégkristály képződés az apoplastban.

A hőstressz a fehérjék szerkezetét és a membránok állapotát is befolyásolja. A növények egyik gyakori védekezési módja a transpirációs hűtés, ha elegendő a környezet vízellátottsága. Emellett a hősokk fehérjék is hatásos és specifikus védelmet biztosítanak a növények számára. A hősokk fehérjék az élővilágban általánosan előfordulnak, és hőmérsékleti indukció nélkül is termelődhetnek magas szinten a sejteken belül. Szerepet játszanak többek között a fehérjék térszerkezetének megóvásában és jelátviteli folyamatokban.

2.2.1.2. Szárazságstressz

Ha a növények számára nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségű és felvehető állapotú víz, szárazságstressz éri őket. Ilyen körülmények lehetnek az aszály, az erős fagy, a talaj magas sótartalma, vagy a felmelegedés következtében erős párologtatás. A védekezési lehetőségek közül az egyik mechanizmus a vízpotenciál magasan tartása (sztómazáródás és a vízakkumuláció fokozásával például), egy másik a vízpotenciál alacsonyan tartása. A vízpotenciál alacsonyan tartását is többféleképpen érhetik el a növények, ezekből az egyik mód az ozmotikus potenciál beállítása az ozmoprotektáns anyagok felhalmozásával. Egy másik lehetőség a kiszáradástűrés. A víz elpárologtatása után a növény citoplazmájának a térfogata összezsugorodik, és a citoplazmában található anyagok koncentrációja megemelkedik. A plazmamembrán elválik a sejtfaltól (sejtfalon belüli nagy légterek keletkeznek) megakadályozva annak szerkezeti károsodását. Szárazságstressz (és sóstressz) hatására megemelkedik az ABS koncentrációja a növényekben, és jelátviteli folyamatokat indít be.

2.2.1.3. Sóstressz

Magas sótartalmú talaj éghajlati zónáktól függetlenül bárhol kialakulhat, bár jórészt a felszáraz, száraz területekre jellemző. A kialakulása több tényezőre is visszavezethető. Oka lehet többek között az elégtelen vízellátottság, a talaj kedvezőtlen fizikai és kémiai adottságai (magas agyagtartalom, tömődöttség, erősen lúgos kémhatás stb.). A tengerpartokon, illetve az olyan folyótorkolatok közelében, ahol az édesvíz keveredik a sós vízzel, szintén magas sótartalommal kell megbirkóznunk a növényeknek. Az öntözéses földművelés következménye is lehet a magas sótartalom kialakulása. Öntözéskor a vízzel együtt sók is kerülnek a talajba, amik az évek során felhalmozódnak. A megművelt területek egyre nagyobb hányadát érinti ez a probléma ami kedvezőtlenül befolyásolja a további növénytermesztést (Rengasamy, 2006). A talajok magas sótartalmának kialakításában a nátrium és klorid ionok (szikes talajok) mellett a kalcium, magnézium, vas és szulfát ionok is részt vesznek. A növényeket sótűrő szempontjából csoportosíthatjuk halofitákra (sótűrő) és glikofitákra (nem sótűrő).

A sóstressz kialakításában a speciális ionhatás mellett az ozmotikus hatás is szerepet játszik. Ekkor a talajban oldott anyagok a gyökérszónában egy alacsony ozmotikus potenciált hoznak létre, ami alacsonyabb a talaj vízpotenciáljánál, és ez befolyásolja a növények vízegyensúlyát. Speciális ionhatásokat akkor említünk, amikor például Na^+ , Cl^- vagy SO_4^{2-} ionok ártalmas koncentrációban halmozódnak fel a sejtekben. Optimális feltételek mellett a növényi sejtek citoszolja 1-10 mM Na^+ és 100-200 mM K^+ tartalmaz. A Na^+/K^+ ionok magas aránya, illetve a sejtek teljes só-koncentrációjának megemelkedése enzimek inaktiválásával és fehérjeszintézis gátlásával járhat (Taiz és Zeigel, 1998)

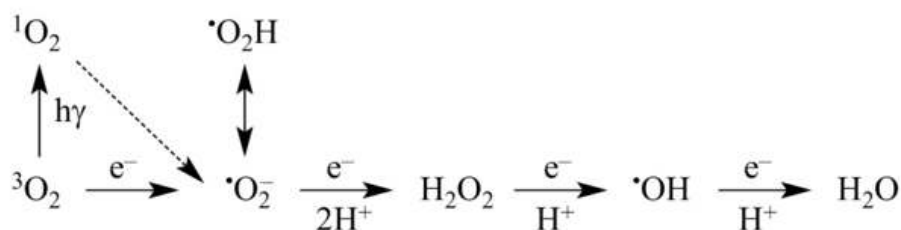
2.2.2. Oxidatív stressz

A legtöbb stressz hatására megváltozik a növények sejten belüli redox állapota, illetve az oxigén anyagcsere folyamatai átmeneti változásokon mennek keresztül, és emiatt különböző reaktív oxigén formák (ROS) keletkeznek. Ilyen következménye lehet például a fénystressznek vagy egyes nehézfémek által kiváltott stressznek, de a növényt a környezetéből közvetlenül is érheti olyan hatás, ami oxidatív stresszt okoz. Az oxidatív stressz leginkább a kloroplasztiszokat károsítja, mert a bennük megtalálható fotoszintetikus pigmentek fotoszenzibilizátorként működve részt vesznek a ROS előállításában. A klorofill

degradáció tehát az egyik, szemmel jól megfigyelhető jele a növényeket érő ROS káros hatásának.

2.2.2.1. Az oxigén reaktív formái

A ROS részben szabad gyökök, mint például a szuperoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), a hidroxil (OH^{\cdot}), a hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), és a nitrogén-monoxid gyök (NO^{\cdot}), amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, részben olyan molekulák, amelyek reakcióik során szabad gyök képzésére képesek, mint például a hidrogén-peroxid (H_2O_2), illetve szabad gyököt nem képeznek, de rendkívül reakcióképesek, mint például a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$). Ezek a gyökök és molekulák a molekuláris oxigénből sorozatos redukcióval keletkeznek (2.2. ábra). A molekuláris oxigén önmaga nem túl reakcióképes. A redukciók során elektronszerkezete azonban megváltozik, a külső elektronszerkezete egy párosítatlan elektronnal fog rendelkezni, s ezáltal rendkívül reakcióképesé válik. Ebből következően számos élettani szempontból jelentős makromolekulát képes károsítani (membránokat, fehérjéket, aminosavakat, nukleinsavakat, stb.). Az egyes ROS-ok nagy reakcióképessége azonban relatív fogalom. A szuperoxid gyök és a nitrogén-monoxid gyök kevésbé aktív, míg a hidroxil gyök szinte azonnal reakcióba léphet más molekulákkal. A többi származék reakcióképessége átmeneti (Apel and Hirt, 2004).



2.2. ábra Reaktív oxigén formák keletkezése

Amellett hogy káros hatóanyagok, a ROS fontos jelátvivő molekulák, amik szerepet játszanak a növények egyedfejlődésében, környezeti stresszhez való alkalmazkodásban, védekezésben és a programozott sejthalálban. Más jelátviteli kölcsönhatásban (pl.: zsírsavjelzések, nitrogén-oxid, kalcium ionok és növényi hormonok) a ROS szabályozzák a fehérjék stabilitását és a gének kifejeződését (Desikan és mtsai., 2001, Laloi és mtsai., 2004, Gechev és mtsai., 2006). Szárazság idején a gázcsere nyílások záródása és más stresszválaszok az abszcizinsav (ABS) által szabályozódik a hidrogén-peroxid (H_2O_2)

jelátviteli úttal kölcsönhatva (Leung és Giraudat, 1998, Li és mtsai., 2000, Finkelstein és mtsai., 2002).

2.2.2.2. Enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok

Oxidatív stressz következtében a optimális körülmények között egyensúlyban lévő ROS képződés és lebomlás folyamataiban bekövetkező változások hatására különböző reaktív gyökök és egyéb aktív oxigén formák halmozódhatnak fel. A növényi sejtek azonban több antioxidáns tulajdonságú molekulával rendelkeznek az ROS-t termelő folyamatok szabályozására és az ROS semlegesítésére. Ide tartoznak a kismolekulájú nem enzimatis antioxidánsok (aszorbinsav, glutation, karotinoidok, stb.), az egyes enzimek (például szuperoxid-dizmutáz, aszorbát-peroxidáz, kataláz, stb.), valamint több összetett enzimrendszer, amely képes hatékonyan védelmezni azokat a sejtalkotókat, amelyekben lokalizáltak.

2.2.2.2.1. Karotinoidok és tokoferolok

A karotinoidok fontos szerepet játszanak a nem-enzimatis védekező mechanizmusokban. Részt vesznek többek között a kloroplasztisz belső membránrendszerének fotooxidatív stressz elleni védelmében. A gerjesztett klorofill molekulák által képezett szinglet oxigént közömbösítik (Siefermann-Harms, 1987), és a klorofilok többlet energiájának átvételével megelőzik a szinglet oxigén képződését.

A tokoferolok nem enzimatis antioxidáns folyamatokban vesznek részt. Egyik legaktívabb tokoferol az E vitamin. Az E vitamint (α -tokoferol) a membránok kettős lipid rétegében található, és védelmet nyújt a lipidperoxidáció ellen. Ezt elsősorban a lipidperoxil gyökök semlegesítésével teszi, amely során az E vitaminból tokoferoxil szabad gyök keletkezik (Cadenas, 1989). Az oxidált vitamin az aszorbát-glutation ciklusban nyeri vissza redukáló képességét.

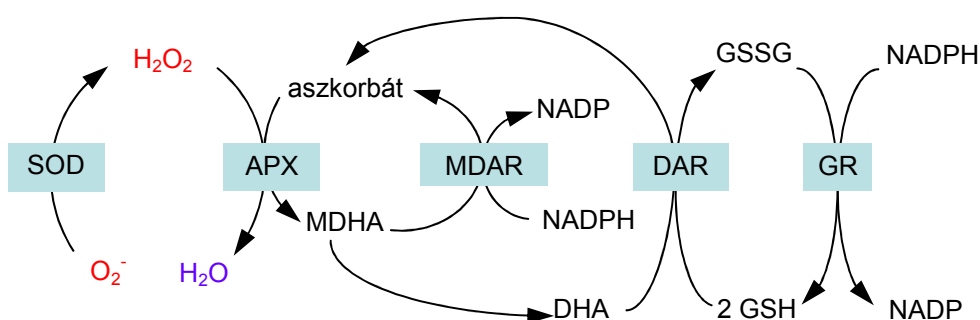
2.2.2.2.2. Szuperoxid-dizmutáz

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) a rendkívül reaktív szuperoxid ($O_2^{\cdot -}$) átalakítását végzi. A SOD fém tartalmú enzim. Attól függően, hogy milyen fémet tartalmaz és hol fordul elő, megkülönböztetünk Cu/Zn-SOD-ot, Mn-SOD-ot, Fe-SOD-ot. A Cu/Zn-SOD a citoplazmában, a kloroplasztiszban és a mitokondriumban, míg a Mn-SOD a mitokondriumban és a peroxiszómában található. A Fe-SOD elsősorban a kloroplasztiszban

fordul elő, de izolálták már citoplazmából, mitokondriumból és peroxiszómából is (Arora és mtsai., 2002). Az enzim a szuperoxid dizmutációját katalizálja, mely során H_2O_2 és O_2 keletkezik.

2.2.2.2.3. Az aszkorbinsav és az aszkorbát-peroxidáz

A növényi szövetekben nagy mennyiségben előforduló aszkorbinsav az egyik legjelentősebb antioxidáns. ROS-kal szembeni védekezésen kívül szerepe van többek között a redox egyensúly szabályozásában, a sejtfal szintézisében és a sejtek hosszanti megnyúlásában (Foyer, 1993). Az aszkorbinsav közvetlenül reakcióba tud lépni a szuperoxiddal és a hidroxil gyökkel, valamint a hidrogén-peroxidot vízzé tudja átalakítani aszkorbát-peroxidáz segítségével a Halliwell-Asada ciklusban (2.3. ábra). Az aszkorbát-peroxidáz megtalálható a glioxiszómákban, a peroxiszómákban, a citoplazmában, a kloroplasztisban és a mitokondriumban (Arora és mtsai., 2002). Az aszkorbát-peroxidáz a H_2O_2 bontása során az aszkorbinsavat monodehidro-aszkorbáttá alakítja, ami közvetlenül vagy dehidroaszkorbáton keresztül képes visszaredukálódni aszkorbáttá. Az aszkorbinsav mellett, hogy direkt gyökfogó, elektrondonorként szolgál az aszkorbát-peroxidáz számára, amely a hidrogén-peroxidnak például a kloroplasztisból történő eltávolításáért felelős (Hossain és mtsai., 1984). Ezen kívül az aszkorbinsav a mitokondriális elektrontranszport lánc IV komplexének az elektrondonorja is lehet (Yu és mtsai., 1975).



2.3. ábra Az aszkorbát redox ciklusa a kloroplasztisban (Halliwell-Ashada ciklus)

APX: aszkorbát peroxidáz; DAR: dehidroaszkorbát reduktáz; DHA: dehidroaszkorbát; GR: glutation reduktáz; GSH: redukált glutation; GSSG: oxidált glutation; H_2O_2 : hidrogénperoxid; MDAR: monodehidro-aszkorbát reduktáz; MDHA: monodehidro-aszkorbát; NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát; NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát hidrogén; O_2^- : szuperoxid gyökanion; SOD: szuperoxid dizmutáz

2.2.2.2.4. A glutation, a glutation-reduktáz és a glutation-peroxidáz

A tripeptid glutation (GS) a nem-protein redukált kén fő előfordulási formája. Jelentős szerepe van a sejtek redox egyensúlyának fenntartásában. Hasonlóan az aszkorbinsavhoz a glutation is képes enzimek közreműködése nélküli, közvetlen reakciókra a ROS-kal. A sejtekben természetes körülmények között a glutation redukált formája (GSH) fordul elő döntő többségben, oxidált formájának (GSSG) mennyiségi növekedése elsősorban oxidatív stressz hatására következik be (Zechmann és mtsai., 2006). A GSSG redukcióját GSH-á a glutation-reduktáz enzim végzi. A GS és a glutation-reduktáz (GR) részt vesz a hidrogén-peroxid lebontásában a citoszolban és a kloroplasztisban működő Halliwell-Asada ciklusban (2.6. ábra).

A glutation-peroxidázok (GSH-PX) a citoszolban és a mitokondriumban előforduló enzimek. A növényekben található GSH-PX elsősorban a lipid- és alkilperoxidok semlegesítéséért felelősek (Horemans és mtsai., 2000).

2.2.2.2.5. Kataláz

A vasporfirin proszтетikus csoportot tartalmazó kataláz enzimek peroxiszómákban, glioxiszómákban és mitokondriumokban fordulnak elő. Jelentős szerepük van ezekben az organellekben a hidrogén-peroxid szint csökkentésében, ahol főleg a fotorespiráció és a zsírsavak bontása során keletkező hidrogén-peroxid vízzé és oxigénné történő átalakításában vesznek részt.

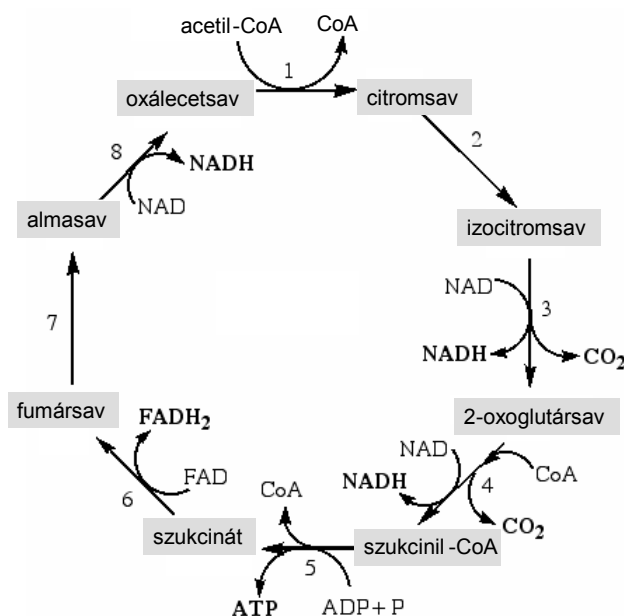
2.3. A mitokondrium és szerepe a sejtben belüli ROS képződésben

A mitokondriumok minden eukarióta sejtben megtalálható, egyik legfőbb energiatermelő organellek. Alakjuk gömb vagy ellipszoid, 0.5-1 μm széles és 1-7 μm hosszú, endoszimbióta eredetű sejtszervecskék. Számuk sejttípusonként változik. A sejteken belüli energia és redox egyensúly fenntartásában a központi szabályozást a mitokondrium látja el, és hozzá szorosan kapcsolódik számos olyan anyagcsere útvonal, amelyik jelentősek a növények környezeti változásokhoz való alkalmazkodásában (Sweetlove és mtsai., 2007).

A mitokondriumokat kettős membrán határolja. A külső membrán kb. 50 %-ban lipidekből és 50 %-ban fehérjékből áll, a belső membrán 70 %-át fehérjék alkotják. A belső membrán több helyen betüremkedik a mátrixba a felület növelése céljából, különböző alakú

krisztákat formálva. A belső membránban helyezkedik el a légzési lánc elektronszállító rendszere, az ATP-szintáz, és több specifikus transzportrendszer. A mátrixban található többek között a citrát ciklus, zsírsav és aminosav oxidáció enzimeit és a piruvát-dehidrogenáz komplex. Anyagcseréjük központjában a sejtlégzés folyamata áll; az itt lezajló citromsav- (citrát-, Szent-Györgyi-Krebs-, 2.4. ábra) ciklus és a hozzá kapcsolódó terminális oxidáció a sejt energiaforgalmában központi szerepet betöltő adenzin-trifoszfátot (ATP-t) állítja elő.

A növényi mitokondriális elektronszállítás egyik lényeges tulajdonsága, hogy semlegesíti a fotoszintézis redukáló kapacitásának a feleslegét, miközben megvédi a tilakoid membránokat és más sejtalkotókat az oxidatív károsodásoktól (Møller, 2001, Raghavendra és Padmasree, 2003). Ezen kívül a mitokondriális elektron transzport részt vesz a ROS termelésben különböző biotikus és abiotikus stressz körülmények között (Møller, 2001, McDonald és Vanlerberghe, 2005). Az elektronszállítási láncban az I komplex (NADH dehidrogenáz) és a III komplex (citokrom c redukáz) a fő helye a ROS képződésének sötétben és nem zöld szövetekben (Møller, 2001, Navrot és mtsai., 2007). A képződött ROS-ok közül a H_2O_2 indukálta oxidatív stressz befolyásolja a NADH szintet a citromsav ciklus enzimein keresztül; a magas H_2O_2 koncentráció gátolja az α -ketoglutarát-dehidrogenáz működését és ezáltal a ciklus meghatározó lépését (Tretter és Adam-Vizi, 2000).



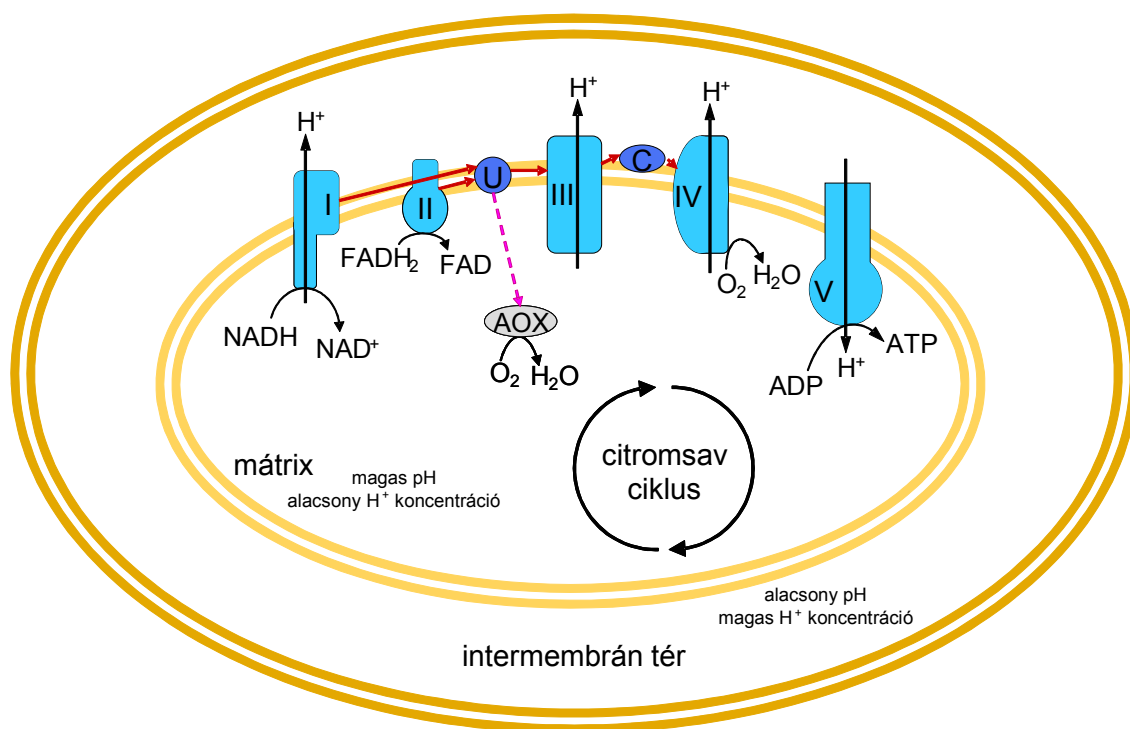
2.4. ábra A citromsav ciklus

1: citrát-szintetáz; 2: akonitáz; 3: izocitrát-hehidrogenáz; 4: α -ketoglutarát-dehidrogenáz; 5: szukcinil-CoA-szintetáz; 6: szukcinát-dehidrogenáz; 7: fumaráz; 8: malát-dehidrogenáz.

2.3.1. Energiatermelés és légzés folyamata

A légzési lánc működése során protonokat pumpál ki a mátrixból a külső és belső membrán közötti (intermembrán) térbe. Az így kialakuló proton gradiens működteti a protontranszporttal kapcsolt ATP szintázt. A légzési folyamat alatt a glikolízisen és a citrát cikluson keresztül szabályozott a redukált szénhidrátok oxidációja, mint például a maláté és a piruváté, illetve NAD(P)H és a FADH_2 termelődik. A NAD(P)H-ról és a FADH_2 -ről az elektronok a molekuláris oxigénre kerülnek a mitokondriális elektron transzport lánc közvetítésével, létrehozva az energiaátadást az ATP és az oxidált NAD(P)^+ és FAD^+ között (Siedow és Day, 2000).

Mint ahogyan az állati mitokondriumokban, a növényeknél is 4 légzési komplexből áll az elektrontranszport rendszer, amik úgynevezett szuperkomplexeket alkotnak (Dudkina és mtsai., 2006), ezek az I komplex (NADH-dehidrogenáz), a II komplex (szukcinát-dehidrogenáz), a III komplex (citokróm c reduktáz) és a IV komplex (citokróm c oxidáz). Az V komplex (ATP-szintáz) nem tagja az elektrontranszport láncnak, de ahhoz szorosan kapcsolódik. Az elektrontranszport folyamata során a NADH-ról az I komplex közvetítésével, a FADH_2 -ről a II komplexen keresztül jut el az elektron az ubikinonig. Az ubikinonról a III komplexen és a citokróm c-n halad tovább az elektron, majd a IV komplexen eljut a végső elektron akceptorhoz, az O_2 -hez (2.5. ábra). Az I, III és IV komplex a transzporttal egyidejűleg protonokat pumpál az intermembrán térbe a mátrixból. A mátrix és az intermembrán tér között proton koncentráció különbség alakul ki (a belső membrán protonokra nézve impermeábilis), ez membránpotenciál különbséget okoz és elektrokémiai gradiens alakul ki. A protonok az V komplex fehérje csatornáján (F_0 alegység) keresztül jutnak vissza a mátrixba. A protonok spontán, az elektrokémiai gradiensnek megfelelő visszaáramlása a mátrixba szabadenergia csökkenéssel jár. Ez adja az energetikai alapot az ADP ATP-vé történő foszforilációjához, amelyet a fehérje komplex F_1 alegysége végez. Az ATP szintézis ezen folyamatát felfedezőjéről Mitchell-féle kemiozmotikus elméletnek nevezték el.



2.5. ábra A növényi mitokondrium elektrontranszport lánc

I: NADH-dehidrogenáz komplex, II: szukcinát-dehidrogenáz komplex, III: citokróm c redukáz komplex, IV: citokróm c oxidáz komplex, V: ATP-szintáz komplex, U: ubikinon pool, C: citokróm c, AOX: alternatív oxidázok, piros nyíl: az elektronok útja a légzési komplexek között az oxidatív foszforiláció során, lila szaggatott nyíl: az elektronok útja cianid rezisztens légzéskor

2.3.1.1. Az oxidatív foszforiláció és a terminális oxidáció

Az oxidatív foszforiláció során az elektrontranszport reakcióiban felszabaduló energia ATP szintézisre fordítódik. A folyamatban elektronok szállítódnak a negatívabb standard redox potenciájú elemről a pozitívabb felé. A mitokondrium belső membránjában kialakult légzési lánc elemei azok standard redox potenciáljai által meghatározott sorrendben követik egymást. A különböző elektronhordozók közötti redox potenciál különbség három esetben teszi lehetővé (I, III, IV komplex), hogy az elektron pozitívabb redox rendszerre kerüléséből fakadó energia az adott komplex proton pumpájának működésére fordítódjon.

Az oxidatív foszforiláció sebességét elsősorban az ADP koncentrációja határozza meg. Ha az ATP/ADP arány az ADP javára tolódik el, fokozódik az oxidatív foszforiláció. Az ADP szint csökkenésével oxidatív foszforiláció intenzitása is csökken. Ezt a szabályozást nevezik akceptor kontrollnak. Az ADP szint a terminális oxidáció sebességét is meghatározza. Az oxidatív foszforiláció gátlása visszahat a terminális oxidációra és gátolja azt.

A citrát ciklus során a NAD^+ -ra és a FAD-ra került hidrogén a terminális oxidáció során a mitokondriumban vízzé oxidálódik, és ez nagymennyiségű energia-felszabadulással jár, ami ATP szintézisre fordítódik. A NADH oxidációja során generált proton gradiens 2,5 mól ATP, a FADH_2 esetén kialakuló proton gradiens pedig 1,5 mól ATP szintézisére elegendő.

2.3.2. Alternatív légzési utak

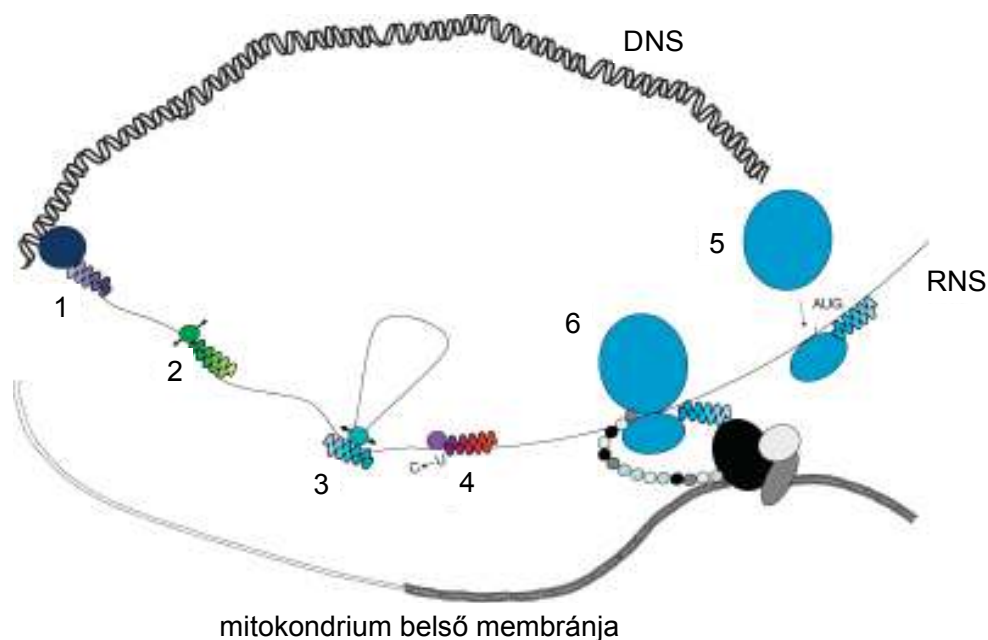
A citokrómokon keresztüli elektrontranszport gátlásakor (cianid rezisztens légzés) az alternatív oxidázok (AOX) segítenek fenntartani az elektronáramlást és a citrát ciklus működését még az oxidatív foszforiláció hiányában is (Plaxton és Podestá, 2006). Ez a növényi lélegzésben biokémiai szinten kialakult specifikus mechanizmus lehetővé teszi a növények számára, hogy jobban alkalmazkodjanak különböző stressz körülményekhez, mint például az alacsony hőmérséklet, a talaj magas sótartalma, szárazság, oxidatív stressz, nehézfém felhalmozódás, oxigénhiány, tápanyaghiány, sebzés és kórokozó fertőzés (Møller, 2001, Plaxton és Podestá, 2006). Az AOX az ubikinon poolból képes felvenni az elektronokat és eljuttatni az O_2 -hez. Cianid rezisztens légzéskor is termelődik ATP, bár jelentősen kevesebb. A nem gátolt (citokrómokon keresztüli) és cianid rezisztens légzés egymással párhuzamosan is működhet a növény fiziológiai állapotától függően. Stressz körülmények között az ATP termelésben a mitokondriális elektron transzport az alternatív oxidázok működésére is támaszkodik, melyek egy elkerülő útvonalat biztosítanak akkor, ha gátolt a III komplex proton pumpája (Vanlerberghe és Ordog, 2002). Az elektronáramlás fenntartása mellett az alternatív oxidáz csökkenteni tudja a reaktív oxigénformák szintjét azokban a helyzetekben, amikor a III és IV komplexek képtelenek a megfelelő működésre.

2.4. A PPR fehérjék családja

A mitokondriumban található fehérjéknek csak 5-10%-a kódolódik az organelum genomjában, míg a működéshez szükséges többi fehérje (2000-3000) a sejtmagban kódolt. Egy ilyen sejtmagban kódolt, csak eukariótákban előforduló fehérje családot jellemeztek 9-15 tandem ismétlődő penta-trikopeptid domén tartalmuk alapján (PPR: pentatricopeptide repeat),

amely rövid szakaszok 35 konzervált aminosavból állnak és fehérjékben 9-15 ismétlődésben fordulhat elő (Small és Peeters, 2000). A PPR ismétlődések helikális szerkezetet alkotnak, és ezeket a szakaszokat tartják az RNS kötésért felelős motívumoknak (Lurin és mtsai., 2004). A PPR domének hasonlóságot mutatnak a tetra-trikopeptid ismétlődő szakaszokhoz (tetratricopeptide repeats, TPR), melyek fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt, és ebből kiindulva feltételezhető a PPR szakaszok fehérje-kötési tulajdonsága is (Small és Peeters, 2000, Blatch és Lasse 1999). Növényekben a fehérjecsalád meglehetősen nagy, *Arabidopsis thaliana*-ban 441 ilyen fehérje ismert (Lurin és mtsai., 2004). Habár néhány PPR gént már azonosítottak az elmúlt években és ismert az is, hogy ezen fehérjék jó részét a mitokondriumban és/vagy a kloroplasztisban lokalizálódhatnak, a legtöbb PPR fehérje biológiai szerepe még nem tisztázott (Andrés és mtsai., 2007).

A mitokondriumban a legjellemzőbb mód a génaktivitás szabályozására a gének kifejeződésének átírás utáni szabályozása.



2.6. ábra A PPR fehérjék mitokondriumban belüli szabályozási funkciói (Andrés és mtsai., 2007)

A PPR fehérjék kapcsolódhatnak a mitokondriális RNS polimerázokhoz (1); részt vesznek az RNS hasításában (2); közreműködnek a splicingban (3) és az RNS editingben (4); szerepet játszanak a transzláció kezdeti szakaszában (5); riboszómákhoz kapcsolódhatnak és néhány esetben rögzíthetik a transzlációs komplexet a mitokondrium belső membránjához, hogy segítsék az újonnan szintetizálódott fehérjék beépülését a megfelelő komplexekbe (6).

A PPR fehérjék szerepet játszanak az organelláris génkifejeződés szabályozásában kontrollálva az RNS metabolizmus különböző aspektusait (2.6. ábra), mint például az RNS érése (sapkázódás, nukleozid modifikációk, metilációk, poli-adeniláció, molekulaszakaszok kivágása és illesztése) és transzlációja (Meierhof és mtsai., 2003, Nakamura és mtsai., 2003, Williams és Barkan, 2003, Andrés és mtsai., 2007). A PPR gének befolyásolhatnak ezért biológiai folyamatokat is, mint például a citoplazmás hímsterilitást (Desloire és mtsai., 2003, Nakamura, és mtsai., 2003), cirkadián óra működését (Oguchi és mtsai., 2004), vagy mag fejlődését (Gutierrez-Marcos és mtsai., 2007).

Néhány PPR gén mutációjának következtében a növények embrióletalitást, csökkent fertilitást és törpe fenotípust mutatnak ami arra utal, hogy ezeknek a fehérjéknek fontos szerepük van a növények növekedésében és egyedfejlődésében (Lurin és mtsai., 2004, Gutierrez-Marcos és mtsai., 2007).

3. Célkitűzések

Dolgozatomban egy, a csoportunkban korábban azonosított *Arabidopsis thaliana* T-DNS inszerciós mutáns növény részletes jellemzését írom le. A mutáció következtében a vizsgált növény csökkent növekedésű volt és fokozott érzékenységet mutatott abszcizinsavval szemben. Ennek a mutánsnak a részletes vizsgálatával szeretnénk jellemezni a mutáció által érintett gén funkcióját, és feltérképezni a génhez kapcsolódó szabályozási utakat. A részletes jellemzésnél a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

- a vizsgált mutáns mutat-e más abiotikus (például oxidatív) stresszel szemben is megváltozott érzékenységet;
- a T-DNS beépülés következtében inaktiválódik-e az adott gén, illetve ez összefüggésben van-e a stresszre adott válaszreakciókkal;
- helyreállítható-e a mutáns megváltozott fenotípusa a gén túltermeltetésével;
- milyen sejten belüli lokalizációt mutat az adott gén által meghatározott fehérje;
- milyen összefüggésben van a fehérje lokalizációja a mutáns stresszérzékenységgel?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti növények és sejtkultúrák fenntartása és kezelése

4.1.1. Növények

Kísérleteink során *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípus, vad típusú (Col-0) és T-DNS inszerciós mutánsokkal - *ppr40-1* és *ppr40-2* - dolgoztunk. A *ppr40-1* mutáns esetében a transzformációt a pTac16 vektorral (Szabados és mtsai, 2002.) végeztük, ami higromicin rezisztenciát hordoz; a SALK gyűjteményből származó *ppr40-2* esetében a pROK2 vektorral (Baulcombe és mtsai, 1986.) generálták a mutánst, ami kanamicin rezisztenciát eredményez. A növényeket steril körülmények között 0.5% szacharóz tartalmú 1/2MS táptalajon növesztettük (Koncz és mtsai, 1994) 22 °C hőmérsékletű növénynevelő szobában 8 óra fény / 16 óra sötét periódus mellett. Függőleges helyzetben történő csíráztatáskor a táptalaj 1.2% agart tartalmazott. Minden fenotípus vizsgálatot legalább 100 maggal vagy csíranövénnyel végeztük három független ismétléssel úgy, hogy az alábbiakban felsorolt körülményeket alkalmaztuk, illetve az alábbi vegyszerekkel egészítettük ki az alap táptalajt:

1/2MS, fény (8 óra fény/ 16 óra sötét)	KCl (30 - 60 - 90 - 120 - 150 mM)
1/2MS, sötét (24 óra sötét)	LiCl (5 - 10 - 15 - 20 - 30 mM)
1/2MS, sötét+etilén (ethephon 10 mg/l)	PEG (25 - 30 - 35 - 40 %)
Hideg (4 °C és 14 °C)	H ₂ O ₂ (5 - 10 - 15 - 20 mM)
ABS (0.1 - 0.2 - 0.5 - 1 µM)	PQ (0.1 - 0.3 - 0.5 - 1 µM)
Glükóz (50 - 100 - 200 - 300 mM)	Metilglioxál (2 - 2.5 - 3 - 3.5 mM)
Mannitol (50 - 100 - 200 - 300 mM)	Aszkorbinsav (1 - 2 - 4 mM)
Szacharóz (100 - 200 - 300 - 400 mM)	aszorbinsav+NaCl (1 - 2 - 4 mM + 150mM)
Glükóz+ABS (200 mM + 0.2 µM)	1.0 mg/l 9-iP; 0.05 mg/l 2,4-D
Mannitol+ABS (200 mM + 0.2 µM)	0.5 mg/l 2,4-D; 0.1 mg/l 9-iP
Szacharóz+ABS (6% + 0.2 µM)	0.5 mg/l 2,4-D; 0.2 mg/l kinetin
NaCl (50 - 100 - 150 - 200 mM)	5 mg/l 2,4-D; 0.2 mg/l kinetin

Sóstressz indukciós kezelésnél három hetes csíranövényeket 6 és 24 órán keresztül tartottunk 150 és 200 mM NaCl-dal kiegészített 1/2MS tápoldatban. Üvegházban növesztett növényeknél 8 óra fény / 16 óra sötét megvilágítási körülményeket és 22 °C hőmérsékletet alkalmaztunk.

Transzgenikus növényeket *Agrobacterium*-közvetített növény transzformációval hoztunk létre, ahol az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (C58C1, rif, pMP90 (pTiC58ΔT-DNS), Gm^r) törzset használtuk (Bechtold és mtsai, 1994).

4.1.2. Sejtkultúrák

Az *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípus és *ppr40-1* gyökér eredetű sejtszuspenziós kultúrákat MS tápoldatban 1 mg/l 2,4-D (2,4-diklór-fenoxi-ecetsav) és 0.2 mg/l kinetin jelenlétében tartottuk fent 22 °C hőmérsékletű növénynevelő szobában 8 óra fény / 16 óra sötét megvilágítási körülményeket alkalmazva, hetente cserélve a tápoldatot. Az *Agrobacterium*-közvetített sejtszuspenzió transzformálásánál a növény transzformáláshoz használt *Agrobacterium* törzseket alkalmaztuk Ferrando és munkatársai (2000) által leírt módon.

4.2. A *ppr40-1* és *ppr40-2* mutánsok azonosítása és jellemzése

A *ppr40-1* mutáns a csoportunk által létrehozott T-DNS inszerciós mutáns gyűjteményből származik, a transzformációhoz használt vektor a pPCVTac16 volt (Szabados és mtsai, 2002). A *ppr40-2* mutánshoz a SALK gyűjteményből (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>, Alonso és mtsai, 2003) jutottunk hozzá. A T2 nemzedéken elvégzett szegregációs vizsgálatokat steril körülmények között, a gyűjtemények által ajánlott szelekciót alkalmazva végeztük. A szegregáció és a T-DNS kapcsoltságának bizonyítására a T-DNS bal és jobb határszekvenciájára homológ primereket és génspecifikus primereket használtunk. A vad típusú allél jelenlétét azon genomi DNS szekvenciák polimeráz láncreakcióban (PCR) történő felerősítése igazolta, amik a valószínűsített inszerciós helyet szegélyzik. A T-DNS beépülésének jelenlétét pedig a T-DNS specifikus (LB31, Lba1) és génspecifikus primerek (PPR40-F, PPR40-R2 és PPR40-R3) kombinációjával végrehajtott PCR reakcióval

bizonyítottuk. A dolgozatban használt primerek felsorolása a függelék 12.1. táblázatában található.

4.3. Molekuláris biológiai alapszerek, plazmid konstrukciók

4.3.1. Alapszerek

Az alapszereket Ausubel és munkatársai (1999) által leírtak szerint végeztük. Ezek közé tartoztak: *Escherichia coli* (DH5 α [F^- ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA*-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-*]) tenyészetekből plazmid DNS tisztítása, DNS-ek gélelektroforézise, DNS fragmentek agaróz gélből való elektroelúciós izolálása, DNS-ek alkalikus foszfáttal való kezelése, ligálása és egyéb módosításai. A DNS-ek restrikciós endonukleázzal történő emésztését mindig az adott enzimre vonatkozóan, a gyártók által javasolt módon hajtottuk végre.

4.3.2. Plazmid konstrukciók

A teljes hosszúságú *At3g16890* gén cDNS-ét PPR40-F és PPR40-R3 (4.1. táblázat) primerek segítségével PCR amplifikálással izoláltuk. A cDNS-t *NcoI*–*BglII* fragmentként pPILY intron-kapcsolt HA-epitóp fúziós vektorba (Ferrando és mtsai., 2000) klónoztuk. A létrejött PPR40-HA konstrukciót *NotI/SacI* fragmentként *SmaI* és *SacI* helyekre klónoztuk pBIN19 (Bevan, 1984) vektorokba a *NotI* restrikciós hasító hely T4-DNS polimerázzal való feltöltése után. A létrehozott új plazmid konstrukciót (függelék 12.1. ábra) *Agrobacterium*-közvetített növény és sejtszuspenzió transzformációkban használtuk fel.

4.4. RNS izolálás és génexpressziós vizsgálatok

Teljes RNS tisztítására Chomczynski és Sacchi (1987) módszerét alkalmaztuk három hetes csíranövényeket vagy izolált mitokondriumokat felhasználva. A vizsgálni kívánt gének expressziós szintjét valós idejű és "semi-quantitative" reverz transzkripciót követő PCR (RT-PCR) segítségével határoztuk meg. Az egyszálú cDNS szintézisét 2 μ g DNáz kezelt (Promega) RNS-sel SuperScriptTM II RNase H⁻ reverz transzkriptázzal (Invitrogen) végeztük 40 U RNase OUTTM rekombináns ribonukleáz inhibitor (Invitrogen) jelenlétében. A valós

idejű RT-PCR-hez a SYBR[®] Green JumpStart[™] Taq ReadyMix[™] (Sigma) reakcióelegyet alkalmaztuk a gyártó cég ajánlása szerint, és az ABI PRISM 7700 szekvencia detektáló rendszert (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) használtuk az alábbi beállításokkal: denaturáció 95 °C / 10 perc, 40-től 45 ciklusig 95 °C / 10 másodperc és 60 °C / 1 perc. A szemi-kvantitatív RT-PCR reakciókat 50 µl reakcióelegyben végeztük 0.2 µg cDNS-t felhasználva 1 U Dupla-Taq[™] DNS polimerázzal (Zenon Bio) a gyártó által javasolt körülmények között az alábbi protokoll szerint: denaturáció 94 °C / 3 perc, majd 35 ciklus 94 °C / 30 másodperc, 60 °C / 45 másodperc, és 72 °C / 1 perc. A felhasznált primerek listája a függelék 12.2. táblázatában található.

4.5. Northern analízis

A Northern analízist Ausubel és munkatársai (1999) által leírt módon végeztük az alábbiak szerint: a tisztított mitokondriális RNS mintákból 20 µg-ot formaldehidet tartalmazó (denaturáló), 1%-os agaróz gélen válsztottuk el. Az elválasztott mintákat kapilláris blottolással vittük át nejlon membránra (Hybond-N, Amersham). Hibridizációs próbaként az apocitokrom b 1 kb hosszúságú fragmentumát használtuk, amit a cob-F2 és cob-R primerek segítségével (függelék 12.2. táblázat) amplifikáltunk fel a 4.4. fejezetben leírt módon előállított mitokondriális cDNS-t felhasználva. A fragmentumot 2 MBq ³²P dCTP-vel jelöltük a Megaprime[™] DNA Labelling System (Amersham) segítségével, a gyártó által javasolt módon. A hibridizációt 42°C-on végeztük egy éjszakán át 50 ml hibridizáló oldatban (0.1% SDS, 5x Denhardt-oldat, 30% deionizált formamid, 5 mM EDTA, 0.9 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 100 µg/ml fragmentált heringsperma DNS, ³²P dCTP-vel jelölt próba). Hibridizálás után a filtereket 0.2xSSC - 0,1% SDS oldattal 65°C-on háromszor mostuk, majd autoradiogramot készítettünk KODAK röntgen film felhasználásával.

4.6. Bioinformatikai alkalmazások

DNS és fehérje szekvenciák homológia vizsgálatához a következő alkalmazásokat használtuk: NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi), TAIR BLAST (www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp).

Fehérjék feltételezett lokalizációs jelének és domén szerkezetének megállapításához és összehasonlításához az alábbi programokat alkalmaztuk: TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>), iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>), Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot/), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

Szekvenciaillesztő programként a ClustalW-t (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) használtuk.

Statisztikai analízisekhez az SPSS 13.0.1 programot (SPSS Inc, Chicago, IL) alkalmaztuk, amivel egy és két szempontos variancia analízist (ANOVA) és Student's t próbát végeztünk.

Denzitometriai elemző programként ImageJ-t használtuk (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.7. Mitokondrium és kloroplasztisz tisztítás

Ép mitokondriumokat egy hetes sejtszuspenziós kultúrából, három hetes steril körülmények között nevelt csíranövényekből és négy hetes tápoldatban növesztett gyökérkultúrából izoláltunk Werhahn és munkatársai (2001) által leírt módon, mindenben követve a közleményben szereplő módszert. 100 g szárazra szűrt sejtszuspenzióból 100 mg sértetlen mitokondriumot sikerült kinyerni, ami 10 mg mitokondriális össz-fehérjével volt egyenértékű. A tisztított mitokondriumokat -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

Kloroplasztiszok izolálását három hetes steril körülmények között nevelt csíranövényekből végeztük Kenneth Cline (Univ. of Florida) által a világhálón közzétett protokollja alapján (www.hos.edu/clineweb/Protocols/PeaIsol.htm).

4.8. Fehérje izolálás és immunoblot analízis

Western blot analízishez a fagyasztott mintákat 0.5% SDS-t tartalmazó RIPA pufferben (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) tártuk fel, ami 1 mM DTT, 2 mM PMSF és 10 µl/ml proteáz inhibitor keveréket (Sigma) tartalmazott. A tisztított fehérje koncentrációjának meghatározását Bradford (1976) alapján, Bio-Rad fehérje meghatározó készlettel végeztük. A fehérjék SDS-poliakrilamid gélelektroforézisét Laemmli (1970) szerint

végeztük 10 - 50 µg fehérjét 8%-os gélen elválasztva. Ezt követően a fehérjéket Immobilon-P PVDF (Millipore) membránra vittük át, majd peroxidáz-kapcsolt monoklonális anti-HA ellenanyaggal (Roche) kezeltük. A HA epitóp-jelölt fehérjék detektálásához a peroxidáz enzim szubsztrátját tartalmazó Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) készletet alkalmaztuk a gyártó leírása szerint.

4.9. Mitokondriális fehérje komplexek elválasztása cukorgrádiensen

A mitokondriális fehérje komplexek cukorgrádiensen történő elválasztását Dudkina és munkatársai (2005) által leírt módon végeztük. PPR40-HA fehérjét termelő sejtszuspenziós kultúrából 40 mg frissen tisztított mitokondriumot felhasználva fehérjét izoláltunk 30 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM kálium-acetát, 10% glicerol és 5% digitonin tartalmú pufferben. A tisztított fehérje kivonatot egy 11 ml-es folyamatos cukorgrádiensre rétegeztük (0.3 - 1.5 M szacharóz), majd 20 órán keresztül centrifugáltuk 150.000 g sebességgel. Az elválasztás után fentről lefelé haladva 800 µl-enként mintákat szedtünk a cukorgrádiensből, és a mintákból 100-100 µl-t analizáltuk Blue-Native gélelektroforézis (BN-PAGE) és western blot segítségével.

4.10. Két-dimenziós Blue-Native/SDS gélelektroforézis

A mitokondriális fehérje komplexek vizsgálatához használt Blue-Native/SDS gélelektroforézist (BN/SDS PAGE) Wittig és munkatársai (2006) által leírt módon végeztük. A mitokondriumok natív körülmények közötti feltárása 50 mM NaCl, 50 mM imidazol-HCl pH 7.3, 2 mM 6-aminokapronsav, 1 mM EDTA és 5 g digitonin (Sigma)/g mitokondriális fehérje összetételű oldattal történt. Az első dimenziót képező BN-PAGE esetében 0.5 - 1 mg fehérjét választottunk el a 4 - 13%-os poliakrilamid grádiens gélen sávonként. A komplexek láthatóvá tételéhez GelCode® Blue Stain reagenst (Pierce) használtunk. A második dimenziót képező SDS-PAGE esetében a fehérjéket (a teljes gélcsávot vagy csak az egy komplexet tartalmazó csíkot) 8 - 16%-os poliakrilamid grádiens gélen választottuk el, és SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Sigma) segítségével tettük láthatóvá.

4.11. Fehérjék azonosítása tömegspektroszkópiával

A fehérjék tömegspektroszkópián alapuló meghatározását az MTA SZBK Proteomika csoportjában végezték az alább leírtak szerint.

A gélben levő fehérjéket redukálás és alkilálás után tripszinnel gélben emésztették (<http://donatello.ucsf.edu/ingel.html>), majd peptidkivonás után LC-MS/MS-sel analizálták. Az MS/MS spektrumokat Mascot és BatchTag kereséssel is analizálták.

4.12. Immunfestési eljárások

Az immunlokalizációs vizsgálatokhoz PPR40-HA fúziós fehérjét túltermelő sejtszuspenziós kultúrát használtunk fel. A sejteket 1% celluláz (Onozuka R-10, Yakult, Tokyo, Japan), 0.5% macerozim R-10 (Yakult, Tokyo, Japan) és 0.16% driszeláz (Sigma) tartalmú, 0.4 M mannitollal kiegészített MS tápoldatban emésztettük négy órán keresztül, majd 100 nM MitoTracker Orange (Molecular Probes) festékkel kezeltük. A sejteket szobahőmérsékleten egy órán keresztül fixáltuk 3.7% formalin tartalmú MTBS (50 mM PIPES pH 6.9, 5 mM MgSO₄, 5 mM EGTA) oldatban (Ferrando és mtsai, 2000). Ezt követően 0.01 M PBS pH 7.2 oldattal mostuk, majd a sejteket poli-L-lizinnel (Sigma) fedett tárgylemezre csepegtettük, és 20 percig 0.5% Triton-X-100-al kezeltük. Első ellenanyagként egér monoklonális anti-HA-t (Sigma) alkalmaztunk 1:200 hígításban PBS oldatban két órán keresztül 37 °C hőmérsékleten. Az első ellenanyag kimosása után Alexa 488-konjugált másodlagos ellenanyagot (Molecular Probes) adtunk a mintákhoz 1:800 hígításban, és egy órán keresztül 37 °C hőmérsékleten tartottuk azokat. Végül a sejteket Citifluor (Ted Pella Inc. CA, USA) oldattal fedtük. A citológiai vizsgálatokhoz Olympus FV1000 Confocal Laser Scanning mikroszkópot használtunk. A maximális nagyítás és felbontás elérése érdekében a megfigyelések nagy részében olaj-immerziós Plan NeoFluar 60x objektívet használtunk.

4.13. Klorofill-tartalom meghatározása

Metilglioxál, H₂O₂ és paraquat kezelt három hetes csíranövényeket (0.05 - 0.1 g) folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, porrá dörzsöltünk és 80% acetont (Reanal) adtunk

hozzá. Legalább két órán át állni hagytuk, majd 10 percig centrifugáltuk (15000 g). A felülúszót 80% acetonnal 1:4 arányban hígítva használtuk a pigmenttartalom meghatározására Lichtenthaler (1987) által leírt módon, 663 nm és 645 nm hullámhosszon mérve.

4.14. Hidrogén-peroxid kimutatása növényekben

4.14.1. DAB festés

A növények H_2O_2 tartalmának meghatározására a 3,3-diaminobenzidin (DAB, Sigma) alapú *in situ* hisztokémiai festést alkalmaztuk Ren és munkatársai (2002) által leírt módon. Négy hetes Col-0 és *ppr40-1* növények leveleit 0.1 mg/ml DAB tartalmú 50mM Tris-acetát pufferbe (pH 5.0) helyeztük, és 5 percig vákuum alatt tartottuk. 24 órán át sötétben tároltuk a mintákat, majd 80%-os etanollal 70 °C hőmérsékleten 15 percig fehéritettük a leveleket. A H_2O_2 tartalmat a megjelenő barna szín jelezte. A festődött leveleket szkenneltük, majd ImageJ programmal elemeztük a képeket.

4.14.2. H_2O_2 képződés mérése

A mitokondriumokon belüli H_2O_2 képződés mérését Dlasková és mtsai. (2006) által leírt módon végeztük Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit-et használva (Invitrogen, Molecular Probes, A22188). 0.3 mg izolált mitokondriumot feloldottuk 10 mM K-foszfát pufferben (pH 7.2), ami tartalmazott még 0.4 M mannitolt, légzési szubsztrátokat (5 mM glutamát, 5 mM szukcinát, 5 mM almasav, 1 mM aszkorbinsav), 0.2 U/ml torma peroxidázt és 50 μ M Amplex Red reagenst. Az elegyet szobahőmérsékleten (25 °C) tartottuk 30 percig, majd a resorufin akkumulációját 560 nm hullámhosszon megmértük (Thermo Labsystems, Multiskan Spectrum), és kalibrációs görbével meghatároztuk meg a H_2O_2 tartalmat.

4.15. Lipidperoxidáció mérése

A lipidperoxidáció mérésére a malondialdehid (lipidperoxidáció során keletkező termék, MDA) tartalom meghatározásán alapuló Heath és Parker (1968) által leírt módszert használtuk. 0.1 g 200 mM NaCl kezelt és kontroll leveleket folyékony nitrogénben

homogenizáltuk, majd 1 ml 0.1% triklór-ecetsavat és 0.1 ml 4% butilált-hidroxitoluolt adtunk hozzá. 15 percig centrifugáltuk (15000 g) 4 °C hőmérsékleten. A felülúszóból kivett 1 ml kivonathoz 4 ml 20% triklór-ecetsavban feloldott 0.5% tiobarbiturinsavat adtunk. 30 percig 95 °C-os vízfürdőben inkubáltuk a mintákat, utána jégen hűtöttük 5 percig. Az abszorbanciát 600 és 532 nm hullámhosszon mértük. A malondialdehid moláris extrinkciós koefficiense ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) alapján számítottuk ki a keletkezett MDA mennyiségét.

4.16. Prolin-tartalom meghatározása

A növényi szövetek szabad prolin tartalmának meghatározását Bates (1973) által leírt módon végeztük. 0.1 g három hetes csíranövényeket folyékony nitrogénnel homogenizáltunk és 3% szulfoszalicilsav oldattal (5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ friss tömeg) jégen tartva összekevertük. A kivonatot 10 percig centrifugáltuk (15000 g), majd 100 μl felülúszóhoz 200 μl 96% ecetsavat és 200 μl ninhidrin oldatot (2.5 g ninhidrin 100 ml 96%-os ecetsav és 6 M foszforsav 60:40 arányú keverékében oldva) adtunk. A mintákat 96 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd 1 ml toluollal extraháltuk. A toluolos fázist 520 nm-en fotometráltuk, és a prolin tartalmat kalibrációs görbe segítségével meghatároztuk.

4.17. Enzimaktivitások fotometriás mérése

4.17.1. Aszkorbát peroxidáz aktivitás mérése

Az aszkorbát peroxidáz (APX) aktivitásának mérése Nakano és Asada (1981) módszere alapján történt. A növényi mintákat homogenizáló pufferben (50 mM K-foszfát puffer pH 7.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% PVP-40, 1 mM aszkorbinsav) jégen eldörzsöltük, majd 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk (15000 g). A felülúszót használtuk enzimakivontként a méréshez. A reakcióelegy 1 ml végtérfogata 830 μl 50 mM K-foszfát puffert (pH 7.0), 20 μl 1 mM aszkorbinsav oldatot, 50 μl enzimakivonatot és 100 μl 10 mM H_2O_2 oldatot tartalmazott. Az aszkorbinsav fogyásából eredő abszorpcióváltozást kvarc küvettában 290 nm-en 2 percig mértük. Egy egység APX aktivitás az a mennyiség, ami képes 1 μM aszkorbinsavat 1 perc alatt oxidálni. Az APX moláris extrinkciós koefficiense 290 nm-en $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, az enzim specifikus aktivitását 1 mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.17.2. Szuperoxid dizmutáz aktivitás mérése

A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitásának mérése a 4-nitro-tetrazóliumkék (NBT) által kiváltott fotokémiai redukció gátlásán alapul (Dhindsa és mtsai., 1981). A növényi mintákat homogenizáló pufferben (1% PVP-40, 0.1 M Na-foszfát puffer pH 7.0, 0.1 mM EDTA) jégen eldörzsöltük, majd leszűrtük és 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk (15000g). A felülúszót használtuk nyers enzimkivonatként a méréshez. A reakcióelegy 1 ml végtérfogata 900 µl 0.1 M Na-foszfát puffer pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 13 mM metionin oldatot, 33 µl 5 mM NBT-t, 34 µl enzimkivonatot és 33 µl 0.2 mM riboflavint tartalmazott. A mintákat erősen megvilágított helyen tartottuk 15 percig, ezt követően 560 nm-en abszorpciót mértünk. A kontroll mintákat sötétben tartottuk. Egy egység SOD aktivitás meghatározása: az a mennyiségű enzim, ami képes 50%-ban gátolni az NBT redukcióját. Az enzim specifikus aktivitását 1 mg fehérjére vonatkoztattuk.

4.17.3. Citokróm c oxidáz aktivitás mérése

A citokróm c oxidáz aktivitásának mérését Szarka és munkatársai (2004) által leírt módon végeztük. Az alapvonalat 0.53 mg/ml citokróm c oldattal 550 nm-em felvettük, majd 0.1 M Na-ditionittal teljes mértékben redukáltuk az oldatot (friss 0.1 M Na-ditionit oldatból 5-8 µl az ideális mennyiség 1 ml citokróm c oldathoz). Fél percen keresztül mértük a redukált citokróm c oldat abszorpcióját, majd a mitokondriális preparátumot hozzáadva további 2 percig figyeltük az abszorpcióváltozást.

A mitokondriumok sértetlenségét az enzim latenciájával jellemezhetjük, ezért a mérést elvégeztük 0.025% Triton-X-100-al kezelt mitokondriumok esetében is. A mérés menete csak annyiban különbözött, hogy 1 ml citokróm c oldathoz 25 µl 1%-os Triton-X-100-at adtunk a mérés előtt. Az enzim aktivitását 1 mg fehérjére vonatkoztattuk (moláris extrinkciós koefficiense 20 mM⁻¹ cm⁻¹).

4.18. Abszcizinsav tartalom meghatározás

Az ABS kvantitatív meghatározása kompetitív ELISA-val (Phytodetek[®] ABA Test Kit, cat.no.: PDK 09347/0096, Agdia, Elkhart, Indiana) történt a gyártó által javasolt módon. 0.2 g növényi szövetet jégen eldörzsöltünk 5 ml 100 mM NaHCO₃-metanol (80:20) elegyével, ami 1 mg butilált-hidroxitoluolt tartalmazott 100 ml-ként. A mintákat kétszer

extraháltuk 4 °C hőmérsékleten 24 órán keresztül, majd beszárítottuk azokat. A (+)-cis-ABS meghatározása növényi kivonatokban azon alapul, hogy az ABS és a tracer (alkalikus foszfatáz jelölt ABS) kompetitíven kötődik a monoklonális ABS ellenanyaggal bevont réteghez. A mérésekhez (+)-cis-ABS (Sigma) hígítási sort használtunk és 405 nm hullámhosszon mértük az abszorpció változásokat.

4.19. Sztómazáródási vizsgálat

A gázcsereenyílasok ABS által indukált záródásának vizsgálatát 4 - 6 hetes növények leveleinek epidermisz nyúzatával végeztük (Leymarie és mtsai., 1998). A kísérlet megkezdése előtt a növényeket 3 órára sötétbe helyeztük. Ezt követően a levelekről epidermisz nyúzatokat készítettünk és 25 mM KCl, 10 mM MES-Tris pH 6.15 oldatba helyeztük. 1 óra inkubáció után különböző mennyiségű ABS-val egészítettük ki az oldatokat, és további 3 órát hagytuk állni. A nyúzatokat tárgylemezre terítettük ki, és Nikon ECLIPSE TE300 mikroszkóphoz kötött SPOT-RT II. kamerával felvételeket készítettünk. Az elkészült képeket ImageJ 1.36. program segítségével elemeztük.

4.20. Aszkorbinsav fogyasztás és légzés vizsgálata mitokondriumban

A gyökérből illetve sejtszuspenzióból izolált ép mitokondriumokon a méréseket a SOTE Orvosi Vegytani Intézetében végeztük.

Az aszkorbinsav fogyasztást reverz fázisú HPLC-vel mérték Szarka és mtsai. (2002) által leírt módon. Az izokratikus elúcitót követő analíziseket Perkin Elmer Series 200 szeparációs modullal és Perkin Elmer Series 200 diode array detektorral (254 nm) végezték. Az elválasztáshoz Teknokroma Nucleosil 100 C18 oszlopot (átlagos részecske méret 5 µm, 25 cm x 4,6 mm) használtak.

A mitokondriális légzés vizsgálatait Ho és mtsai. (2007) által leírt módon végeztük kisebb módosításokkal. 25 µg izolált mitokondriumot 1 ml reakcióelegybe tettük (0.3 M mannitol, 10 mM MOPS, 5 mM KH₂PO₄, 10 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 1 % BSA, pH 7.5), és az oxigén fogyasztást 25 °C-on mértük Clark típusú oxigén elektróddal (Hansatech Oxytherm, Hansatech UK). A következő légzési szubsztrátokat és gátlószereket használtuk a megadott

koncentrációkban: NADH (1.5 mM), szukcinát (5 mM), piruvát (5 mM), ADP (0.3 mM), ATP (0.3 mM), rotenon (10 μ M), antimycin A (10 mM), KCN (1 mM), SHAM (2 mM), aszkorbinsav (1 mM), dithiothreitol (2 mM).

5. Eredmények

5.1. A *ppr40* mutánsok azonosítása

T-DNS inszerciós mutagenézis programunk során (Szabados és mtsai., 2002) azonosítottunk egy transzgenikus *Arabidopsis* vonalat, melynél a mutáció következtében abszcizinsav (ABS) érzékenységet és csökkent méretet (semidwarf) figyeltünk meg. Az ezt követő csírázási és növekedési vizsgálatokban azt tapasztaltuk, hogy a mutáns növény nem csak ABS-ra, de cukorra és sóra is érzékeny volt, és az érintett lókuszt *ppr40-1*-nek (Lurin és mtsai., 2004 alapján) neveztük el. A *ppr40-1* mutáns jellemzésekor azonosítottunk egy tandem fordított (LB-RB/RB-LB) T-DNS beépülést az *At3g16890* gén átíró régiójába. A T-DNS beépülés egy 4 bázispárnyi kivágódást okozott az ATG kodontól 311 bázispárnyira a 3' irányba (5.2. A ábra). Megvizsgáltunk egy másik allélt is, amelyhez a SALK inszerciós mutáns gyűjteményből (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) jutottunk hozzá, és amit *ppr40-2*-nek neveztünk el (SALK_071712). Ennél a mutánsnál a T-DNS beépülés az ATG kodontól 852 bázispárnyira volt 3' irányban, és 5 bp-i kivágódást okozott (5.2. A ábra). Mindkét esetben megállapítottuk, hogy a mutánsok csak egy T-DNS inszerciót tartalmaznak. Következő lépésként homozigóta vonalakat izoláltunk, és a későbbiekben azokkal dolgoztunk.

A PPR40 gén (At3g16890) egy exont tartalmaz, ami 1980 bp hosszúságú. A génről egy 659 aminosavból álló és 74.26 kDa tömegű fehérje szintetizálódik (5.1. ábra). A PPR40 fehérje a PPR fehérjecsalád P alosztályába tartozik (PPR modell: PPR_3_5768407, Lurin és mtsai., 2004), egy feltételezett mitokondriális target jelet és 14 konzervált pentatrikopeptid motívumot tartalmaz, a PPR-ek két doménban különülnek el (5.3. C ábra). Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) analízis segítségével igazoltuk a teljes hosszúságú At3g16890 transzkript hiányát a homozigóta *ppr40-1* és *ppr40-2* mutánsokban (5.2. B ábra), illetve egy 3' végen csonkított transzkript jelenlétét mindkét allél esetében, amelyekhez a PPR40F + PPR40R1 oligonukleotid kombinációt használtuk, melyek 5' irányban helyezkednek el a *ppr40-1* mutáns T-DNS inszerció beépülési helyétől. A PPR40F + PPR40R2 oligonukleotidok 5' irányban helyezkednek el a *ppr40-2* mutáns T-DNS inszerciós pontjától, és a segítségükkel az említett szakaszból átíródó részleges mRNS-ek jelenlétére következtethettünk: erről a részből átíródást csak a *ppr40-2* és a vad típusú

```

1                                     mrgfa
6 ssasriataaaaaskslnastsvnpklsktltnssgk
41 ptnplnqryisqvierkdwflilnqeftthrigln
76 trfvisvlgnqndnplhslrfylwvsnfdpvyakdq
111 SLKSVLIGNALFRKGPLLLSMELIKETIRDSGYRISD
146 ELMCVLIGSWERLGLAKYCNVDEAQISFLGMKEST
181 RLYNAVIDALVKSNSLDLAYLKEQQMRSDGCKPDR
216 FTYNILIHGVCKKGVVDEAIRLVKQMEQEGNRPNV
251 FTYTILIDGELIAGRVDEALKQLEMVRVRKLNENE
286 atirtfvhgifrcfpckafevlvgfmeakdsnlqr
321 VGYDAVLYCLSNNSMAKETGQFLRKIGERGYIPDS
356 STFNAAMSCLLKGHDLVETCRLEDGEVSRGVKPGF
391 NGYLVLVQALLNAQRFSEGDRYLKQMGVDGLSSV
426 YSYNAVIDCLCKARRIENAMFLTEMQDRGISPNL
461 VIFNTFLSGYSVRGDKVKVHGVLKILLVHGFKPDV
496 IIFSLIINCLORAKEIKDAFDCEKEMLEWGIEPNE
531 ITYNILIRSCSTGDTDRSVKLEAKMKENGSLPDL
566 YAYNATIQSECKMRKVKKAEELKTMRLRIGLKPDN
601 FTYSTLIKALSESGRESEAREMFSSIERHGCVPDS
636 ytkrlveeldlrksglsretvsas

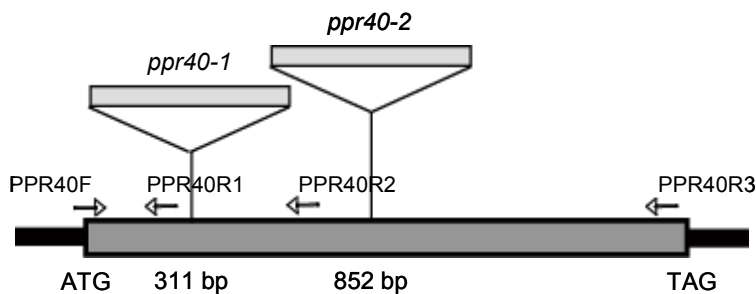
KON . TYNALH..LC..G..dEA...LF...M...G.KPd.

```

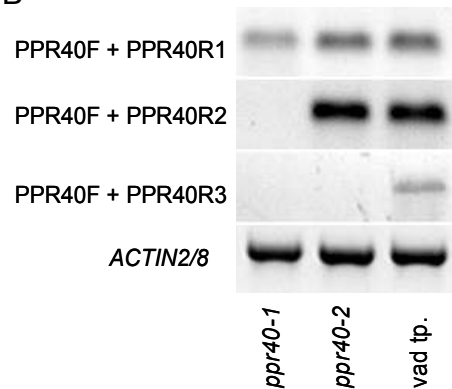
5.1. ábra A PPR40 doménszerkezete

piros: kicsi (kicsi + hidrofób(aromásokkal együtt - Y)); **zöld:** hidroxil + amin + bázikus - Q; **szürke:** savas; **sárga:** bázikus; **kék:** prolin; aláhúzott: valószínűsített mitokondriális target peptid rész; keretezett: feltételezett mitokondriális hasítási hely

A



B



5.2. ábra A T-DNS inszerciók helye a *ppr40-1* és *ppr40-2* mutációkban és a mutációk RT-PCR analízise

A: T-DNS inszerciók helye az *At3g16890* génben. Az ábrán nyilakkal jelöltük a gén-specifikus oligonukleotidok elhelyezkedését az inszerciókhoz képest, melyeket RT-PCR analízishez használtuk.

B: A *ppr40-1* és *ppr40-2* mutációk és vad típusú (Col-0) növények RT-PCR analízise. Különböző oligonukleotidok kombinációkat használva vizsgáltuk az *At3g16890* cDNS kifejeződését a transzgenikus növényekben *ACTIN2/8* belső kontroll mellett.

növényeknél tapasztaltunk (5.2. B ábra). Az RT-PCR eredményei azt mutatják, hogy mind a *ppr40-1* mind a *ppr40-2* esetében egy C terminálisan csonkított fehérje íródhat át. A *ppr40-1*

allél esetében ez a feltételezett fehérje 121 aminosavból állhat, aminél 103 aminosav a *PPR40*-en, 18 aminosav pedig a T-DNS-en kódolódik (5.3. A ábra). A feltételezett átíródáskor a részleges fehérje csak a mitokondriális lokalizációs jelet tartalmazná, de egyetlen PPR domént sem. A *ppr40-2* allél esetében egy 318 aminosavból álló fehérje képződhet, ami 284 *PPR40* kódolt és 34 T-DNS kódolt aminosavból állhat, és a lokalizációs jelen kívül 5 PPR domént is tartalmazna (5.3. B ábra). Bár eddig nem bizonyítottuk ezeknek a részleges fehérjéknek a létezését a *ppr40* mutánsokban, de abból kiindulva, hogy a *ppr40-2* allélban bekövetkezett mutáció eredményeként egy kevésbé jellegzetes fenotípus jött létre mint *ppr40-1*-ben (lásd később), arra következtettünk, hogy a PPR40-2 fehérjének lehetséges szintézise egy részleges funkció veszteséggel járó fenotípust eredményez.

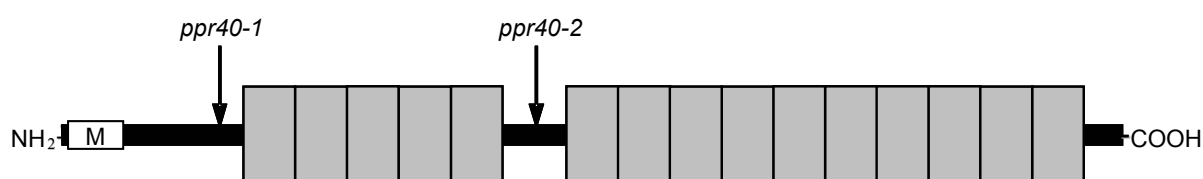
A

MRGFASSASRIATAAAASKSLNASTSVNPKLSKTLNSSGKPTNPLNQRYISQVIERKDWFLILNQEFTHRIGLNTRFV
ISVLQNQDNPLHSLRFYLVWSNFDPAVNCKWLHVREIYMDQQ*

B

MRGFASSASRIATAAAASKSLNASTSVNPKLSKTLNSSGKPTNPLNQRYISQVIERKDWFLILNQEFTHRIGLNTRFV
ISVLQNQDNPLHSLRFYLVWSNFDVPYAKDQSLKSVLGNALFRKGPLLLSMELLKEIRDSGYRISDELMCVLIGSWG
RLGLAKYCNDVFAQISFLGMPSTRLYNVIDALVKSNSLDLAYLKFQQMRSDGCKPDRFTYNILIHGVCKKGVVD
EAIRLVKQMEQEGNRPNVFTYITILIDGFLIAGRVDEALKQLEMMRVRKLNPN^{SRIYCGVNKLTLRQLNNTLRTFLM}
YWGGFSFHQ*

C



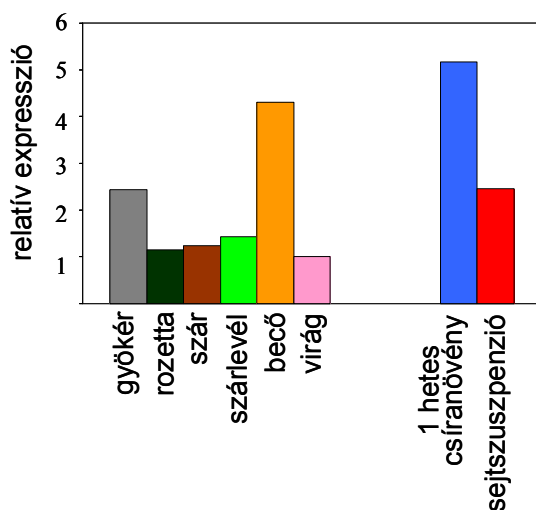
5.3. ábra A PPR40 fehérjék feltételezett aminosav sorrendje és doménszerkezete a *ppr40-1* és a *ppr40-2* mutánsok esetében.

A: a *ppr40-1* mutáns. B: a *ppr40-2* mutáns. A sötét színnel kiemelt rész a T-DNS-en kódolt mesterségesen képződő fehérje szakasz, ami a PPR40 fehérjével fúziós fehérjét képez.

C: A PPR40 fehérje doménszerkezete. M: mitokondriális lokalizációs szignál, szürke téglalap: PPR domén, a nyilak a T-DNS inszerció helyét jelölik.

5.2. *ppr40-1* mutáns növények fenotípusának jellemzése

Arabidopsis thaliana microarray adatbázisokban megtalálható információk szerint a *PPR40* gén állandó alacsony szinten fejeződik ki az összes növényi szövetben a teljes egyedfejlődés alatt, és nem mutat jelentősebb eltérést a különböző stressz kezelések hatására sem (<https://www.genevestigator.ethz.ch>, Zimmermann és mtsai., 2004). Ezeknek az adatoknak az igazolására megvizsgáltuk a *PPR40* expressziós mintázatát kvantitatív RT-PCR-rel vad típusú növény szerveiből nyert RNS mintákat felhasználva. A *PPR40* transzkript mennyisége átlagosan három nagyságrenddel kevesebb volt, mint a referenciaként használt *ACTIN2/8* mRNS szintje, és minden vizsgált szervben megtalálható (5.4. ábra); nagyobb mennyiségben csak az éretlen (zöld) magtokban és fiatal csíranövényekben volt jelen.



5.4. ábra A *PPR40* gén kifejeződése különböző növényi szervekben és szövetekben

Relatív expresszió: a virágban mért transzkript mennyiségéhez (1) viszonyítva

Kísérleteinkben a *PPR40* mRNS szintjét lényegesen nem befolyásolta sem a növényi hormonok hatása (pl. auxin, citokinin, etilén, szalicilsav), sem a különböző stresszkezelések (só, ozmotikumok, hideg).

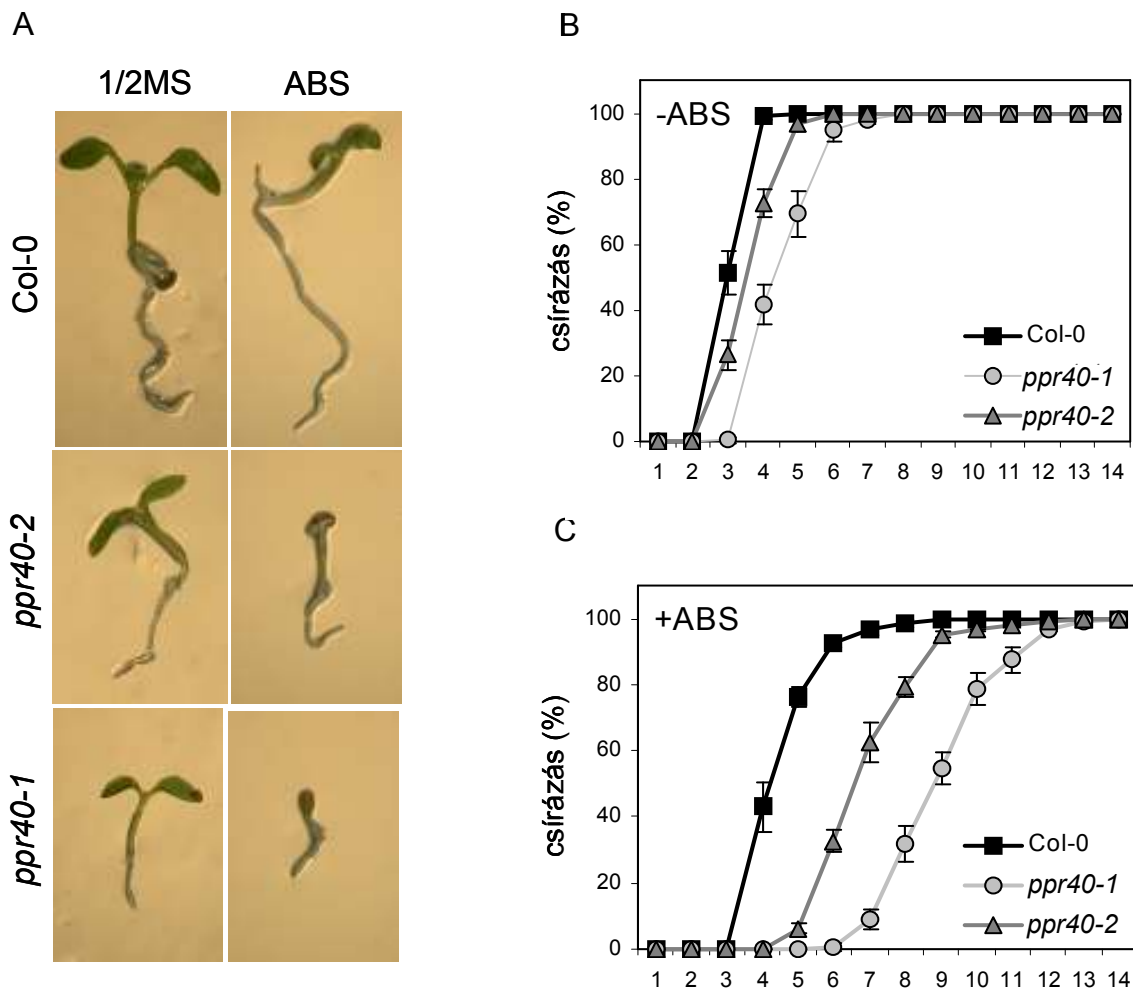
Üvegházban nevelt *ppr40-1* növények rozetta leveleinek mérete 50-60%-kal, míg a *ppr40-2* növények rozetta levelei 20%-kal voltak kisebbek, mint a vad típusú növényeké (5.5. ábra).



5.5. ábra Cserépben nevelt négy hetes *ppr40-1*, *ppr40-2* és vad növények

Mindkét *ppr40* mutáns fertilis és maghozama hasonló a vad növényekéhez. A magok csírázása a mutáns növényeknél egy kissé későbbre tolódik; miközben a vad növény magjainak 100%-a kicsírázik a negyedik napra, a *ppr40-1* és *ppr40-2* növények magjainak kicsírázása eltolódik kettő, illetve egy nappal (5.6. A ábra). Mivel munkánk kezdetén a *ppr40-1* mutáns ABS érzékenysége miatt lett kiválasztva, megvizsgáltuk a másik allél esetében is a ABS hatását. 0.5 μ M ABS-val kiegészített 1/2MS táptalajon csíráztatott *ppr40-1* és *ppr40-2*-nél hét nap elteltével a 20%-a illetve 60%-a csírázott ki a magoknak, míg a vad allél esetében ez az arány 98% volt (5.6. B ábra). A fenotípusbeli eltérés a rozetta növekedésében és az ABS érzékenységben azt mutatja, hogy a *ppr40-1* feltehetőleg a null allél, míg a *ppr40-2* esetében a mutáció egy részlegesen megváltozott "leaky" fenotípust okoz, aminek oka lehet többek között a már fent említett nem teljes hosszúságú fehérje képződése a növényben. Ezért a későbbi vizsgálatokhoz csak a *ppr40-1* mutáns növényeket használtuk.

Mivel szeretnénk volna megvizsgálni a *PPR40* jelentőségét a környezeti tényezők változása és a növényi hormonokra adott válaszok szabályozásában, egy átfogó csírázási és növekedési teszt sorozatot végeztünk *in vitro* és üvegházi körülmények között (függelék 1. táblázat).



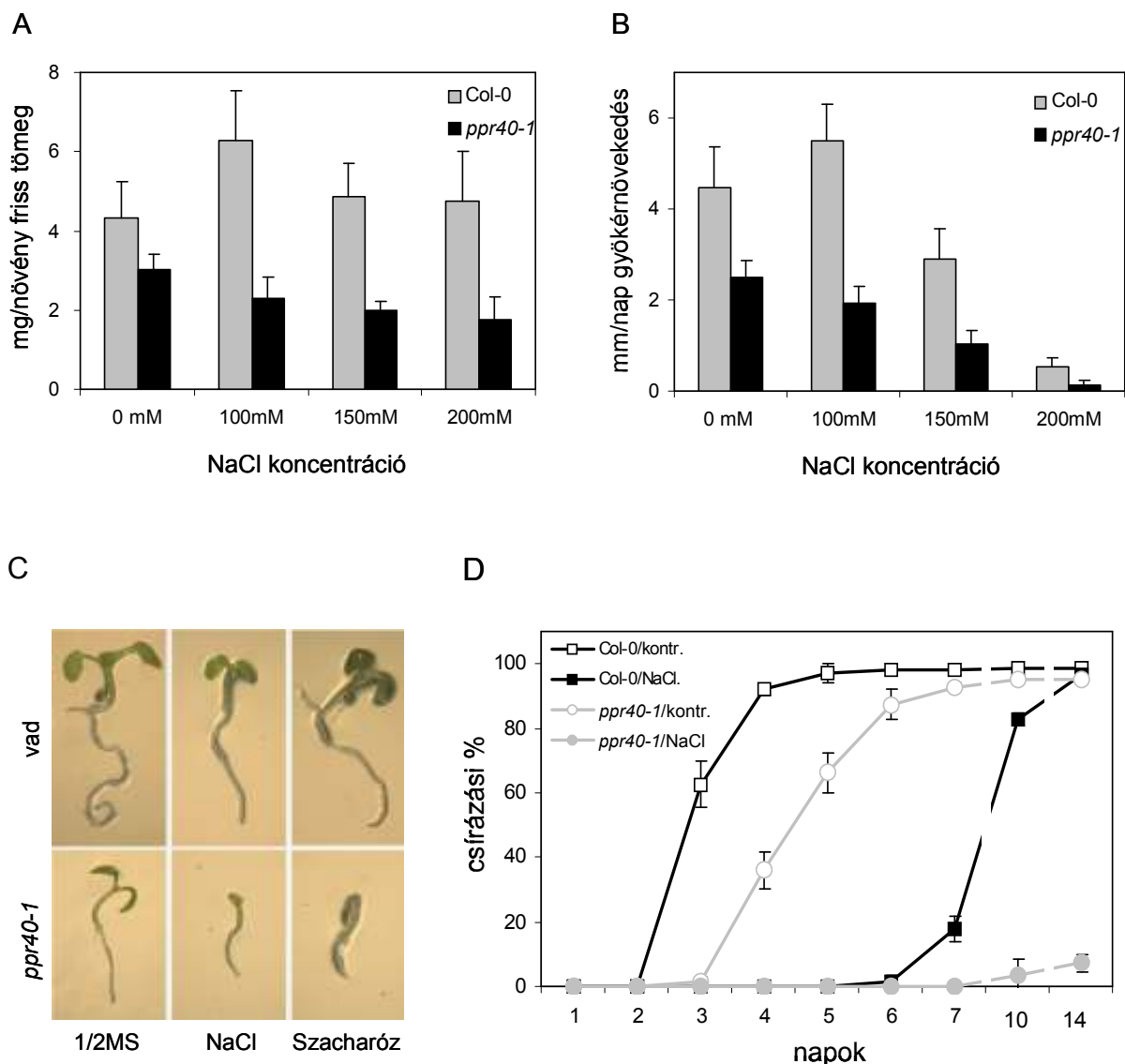
5.6. ábra ABS érzékenység vizsgálata *ppr40-1* és *ppr40-2* mutánsoknál

A: 7 napos csíranövények 1/2MS (kontrol) és 0.5 μ M ABS tartalmú táptalajon történő csírázás után.

B: Csírázási teszt Col-0, *ppr40-1* és *ppr40-2* növényekkel 1/2MS táptalajon.

C: Csírázási teszt Col-0, *ppr40-1* és *ppr40-2* növényekkel 0.5 μ M ABS-val kiegészített 1/2MS táptalajon.

A só hatásának ellenőrzésére a *ppr40-1* és Col-0 magokat egyrészt 0-200 mM NaCl tartalmú táptalajon kicsíráztattuk, másrészt a gyökérfejlődést és a növények növekedését követtük nyomon 1/2MS táptalajon 1 hétig nevelt, majd különböző NaCl tartalmú táptalajra átrakott csíranövényeknél. A kísérletekben a *ppr40-1* magok csírázási képességét jelentősen gátolta a NaCl (5.7. D ábra). Hasonló eredményt kaptunk szacharóz (5.8. ábra), glükóz és mannitol hatására is.



5.7. ábra NaCl hatása a *ppr40-1* növények csírázására és növekedésére

A: Friss tömeg mérése 10 napig különböző NaCl koncentráción nevelt vad (Col-0) és *ppr40-1* csíranövényeknek.

B: Függőleges helyzetben kicsíráztatott vad típusú és *ppr40-1* csíranövények gyökér megnyúlásának mérése.

C: 7 napos vad és *ppr40-1* csíranövények 200 mM NaCl és 300 mM szacharóz tartalmú táptalajon 1/2MS kontroll mellett.

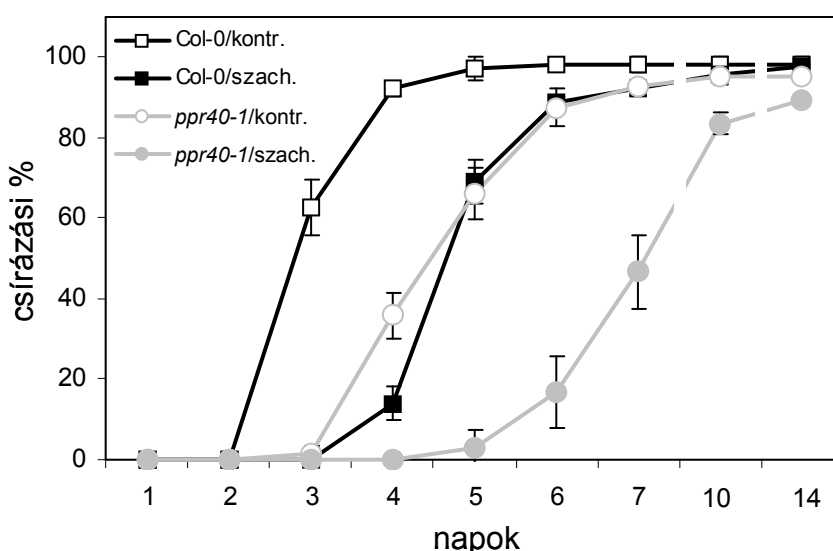
D: Csírázási teszt vad és *ppr40-1* növényekkel 200 mM NaCl-dal kiegészített 1/2MS táptalajon, a kontroll 1/2MS

A *ppr40-1* növények gyökernövekedési sebességét függőleges helyzetű 1/2MS táptalajon mérve 40%-os csökkenést tapasztaltunk (5.7. B ábra), míg 100 és 150 mM NaCl jelenlétében 65% illetve 75% megnyúlási különbséget láttunk. 200 mM NaCl gyakorlatilag teljesen megállította a gyökerek növekedését a *ppr40-1* mutánsoknál miközben a vad növényeknél egy nagyon lassú, de állandó megnyúlást figyelhattunk meg. A só által kiváltott stressz hatással

volt a *ppr40-1* növények általános növekedésére is, amit a friss tömeg változásával tudunk mérni (5.7. A ábra).

A *ppr40-1* mutáció által kiváltott fenotípusbeli változások megjelenése a sóra és az ozmotikus válaszra korlátozódik, mivel megfigyeléseink közben nem találtunk különbséget csírázásban és növekedésben más környezeti tényezők változására adott válaszokban (folyamatos fény és sötét), illetve hősokk és nehézfémek okozta stressz hatására. Az ABS kivételével a *ppr40-1* mutáns és a Col-0 hasonló módon viselkedett növényi hormonokkal történő kezelések hatására (például auxin, citokinin, etilén, szalicilsav, gibberellin és brasszinoszetoid, függelék 1. táblázat)

Az eredményeink azt mutatták, hogy a *ppr40-1* mutáns az abszcizinsavon kívül a NaCl-ra, ozmotikus stresszre és cukorra mutat csak fokozott érzékenységet.



5.8. ábra Szacharóz hatása a *ppr40-1* csírázási képességére

300 mM szacharóz tartalmú 1/2MS táptalajon csíráztatott *ppr40-1* és vad növények; kontroll: 1/2MS táptalaj

5.3. A *ppr40-1* mutáns genetikai komplementációja és a transzgenikus T2 nemzedék vizsgálata

A *ppr40-1* mutáció és az általa kiváltott fenotípusbeli változások közti összefüggés további igazolására genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk. Az *At3g16890* gén intron nélküli genomi fragmentjét PCR-ban történő amplifikációval izoláltuk, és pPILY intron-kapcsolt HA-epitóp fúziós vektorba (Ferrando és mtsai., 2000) klónoztuk (függelék 12.1. A ábra), majd a hibátlan konstrukciót szekvenálás segítségével választottuk ki. A pPILY

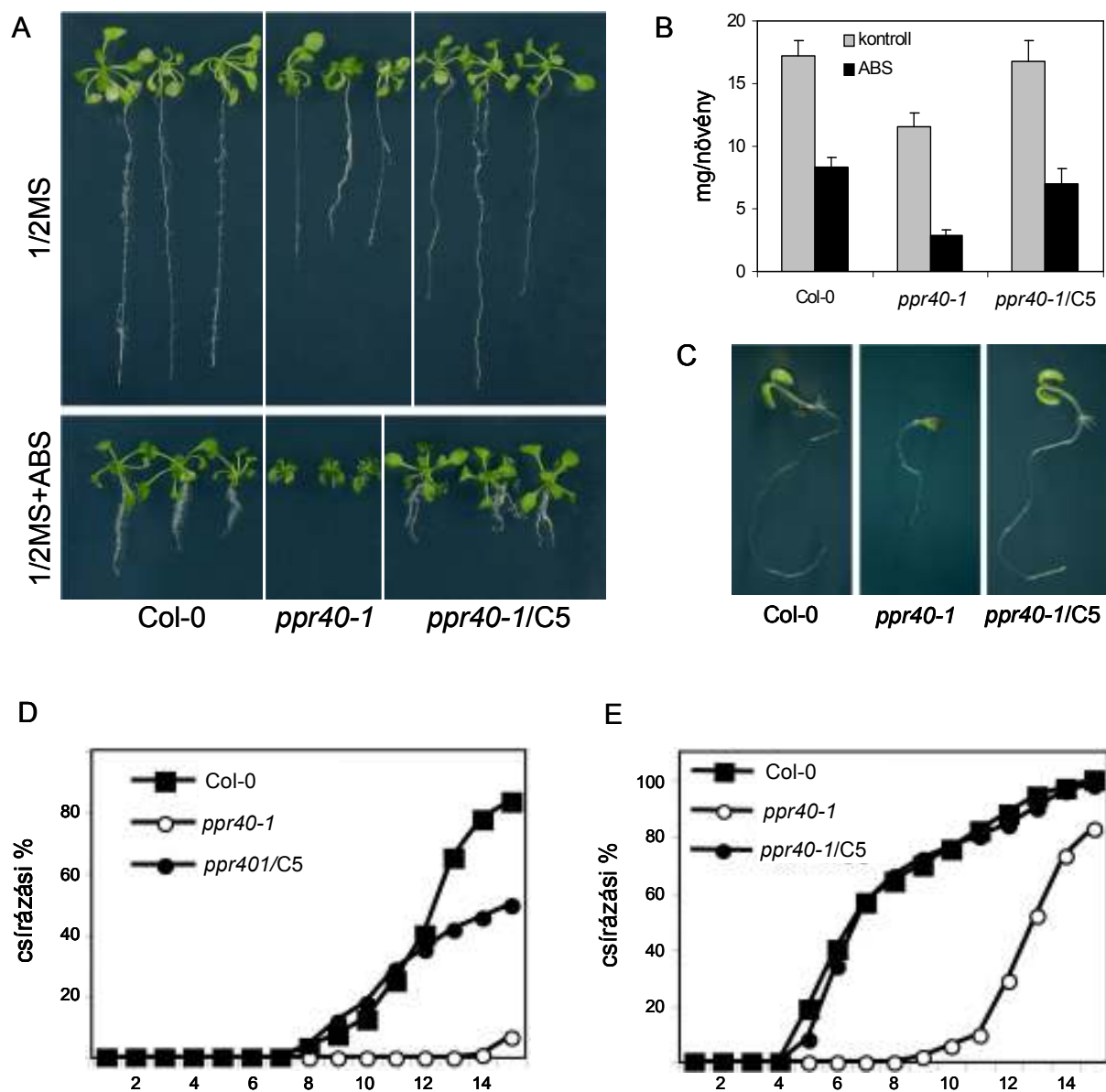
vektorban a *PPR40-HA* fúziós gént egy erős, konstitutív expressziót biztosító virális 2xCaMV35S promóterrel építettük össze. Az *Agrobacterium*-közvetített génátvitelhez a 2xCaMV35S-PPR40-HiA régiót T-DNS transzformációs vektorba, a pBin19-be (Bevan 1984) helyeztük (függelék 12.1. B ábra). Az így létrehozott bináris vektor konstrukciót *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 törzsbe vittük, majd *ppr40-1* mutánsokat transzformáltuk velük. A létrehozott transzgenikus növényekben a PPR40-HA gén expresszióját RNS és fehérje szinten is ellenőriztük, és 10 alvonalat kiválasztva T2 nemzedékeket hoztunk létre, és ezeket további analízisnek vetettük alá.

Üvegházban és steril körülmények között nevelt genetikailag komplementált *ppr40-1* növényeknél nem tapasztaltuk a *ppr40-1* növényekre jellemző csökkent növekedést (5.9. és 5.10.A ábra), a transzgenikus növények a vad típushoz hasonlóak voltak. A PPR40-HA túltermeltetése a mutánsokban az ABS és só által kiváltott fokozott érzékenységet is



5.9. ábra Üvegházban nevelt négy hetes vad típusú, *ppr40-1* mutáns és *ppr40-1* komplementált (C5 jelű) növények

helyreállította (5.10. ábra). Akár a csírázási képességet, akár a növekedési sebességet néztük, egymástól némileg eltérő mértékben, de minden esetben a vad típushoz hasonló fenotípust figyelhattunk meg a túltermelő transzgenikus növényeknél. A PPR40-HA fehérje túltermeltetése helyreállította a vad fenotípust, és ez a tény megerősítette azt az álláspontunkat, hogy valóban az *At3g16890* génbe beépülő T-DNS okozta mutáció felelős a *ppr40-1* növények stresszérzékeny és redukált növekedési fenotípusért.



5.10. ábra A *ppr40-1* mutáns komplementációja

A: Függőleges helyzetben, kontroll (1/2MS) és 0.5 μ M ABS tartalmú táptalajon nevelt 3 hetes növények

B: Kontroll (1/2MS) és 0.5 μ M ABS tartalmú táptalajon nevelt 3 hetes növények friss tömeg mérése

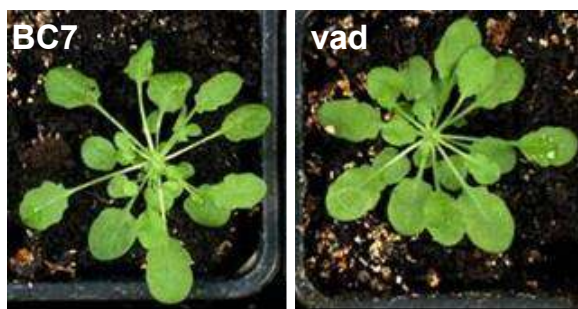
C, D: 200 mM NaCl tartalmú táptalajon csíráztatott 10 napos növények (C) és a csírázási képesség követése (D) 15 napon át

E: 0.5 μ M ABS tartalmú táptalajon történő csíráztatás; a *ppr40-1/C5* növény fenotípusa megegyezik a Col-0-val

5.4. A PPR40-HA fehérje túltermeltetése vad típusú növényekben

Miután egyértelműen igazoltuk a T-DNS beépülése által kiváltott mutáció és a *ppr40-1* fenotípusa közötti összefüggést, arra voltunk kíváncsiak, hogy a *PPR40* gén túltermeltetése vad típusú növényekben okoz-e megváltozott stresszérzékenységet? Transzgenikus növények létrehozásához ugyanazt a bináris vektor konstrukciót használtuk, amit a genetikai komplementációs kísérletek folyamán (függelék 12.1. B ábra). *Agrobacterium*-közvetített növény transzformációval vad típusú növényekbe juttatuk a *PPR40-HA* fúziós gént, majd a gén expresszióját RNS és fehérje szinten is ellenőriztük. 12 kiválasztott alvonalból T2 nemzedékeket hoztunk létre, és ezeket további analízisnek vetettük alá.

Üvegházban nevelt *PPR40-HA* túltermelő növényeknél nem tapasztaltuk szignifikáns csírázási és növekedési különbséget a vad típushoz képest (5.11. ábra).

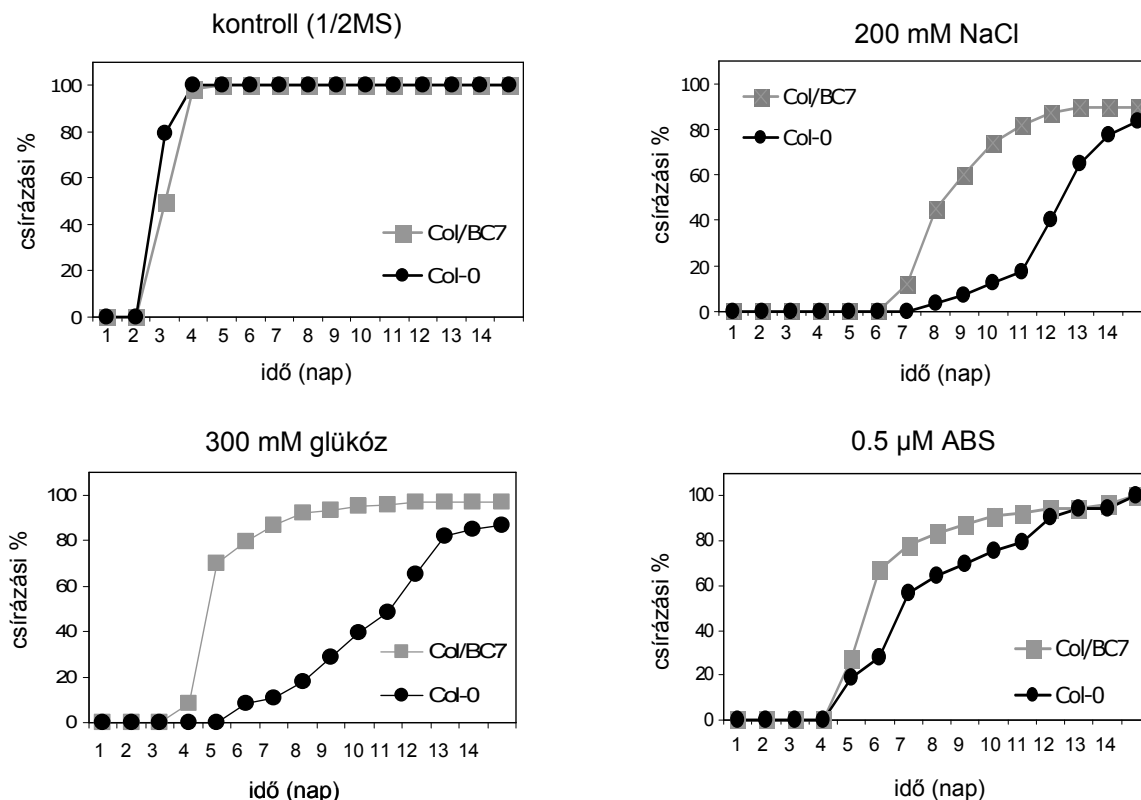


5.11. ábra Üvegházban nevelt négy hetes vad típusú és *PPR40-HA* túltermelő (BC7 jelű) növények

A *PPR40* túltermelő vonalak stressztűrő képességének teszteléséhez a növények csírázási képességét vizsgáltuk. Steril körülmények között, különböző koncentrációjú NaCl-dal, cukorral és ABS-al kiegészített táptalajon csíráztattuk ki a magokat (ld: 4.1.1. fejezet). 14 napon keresztül követtük nyomon a fejlődésüket, és azt tapasztaltuk, hogy a túltermelő növények (a bemutatott példa esetében a Col/BC7 jelű vonal) fokozott toleranciát mutattak 200 mM NaCl-al és 300 mM glükózzal szemben (5.12. ábra). 0.5 μ M ABS jelenlétében is hamarabb csíráztak ki a *PPR40* túltermelő vonalak, bár itt a különbség kisebb volt (5.12. ábra). Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a *PPR40* fehérjének fontos ozmotikus stresszel szembeni védő szerepe lehet, de ennek bizonyítása még további kísérleteket igényel majd.

Mivel munkánk során a *ppr40-1* mutáns jellemzésére, illetve a *PPR40* fehérje lehetséges funkciójának megtalálására összpontosítottunk elsősorban, ezért a túltermelő vonalak részletesebb analízisét a későbbiekben kívánjuk elvégezni. Emellett tervezzük a

PPR40 fehérje túlermeltesítését más növényfajokban (dohány, repce), és az így előállított transzgenikus növények alapos vizsgálatát ozmotikus és sóstressz hatásaival szemben.



5.12. ábra A PPR40-HA túlermelző növények csírázási fenotípusának vizsgálata

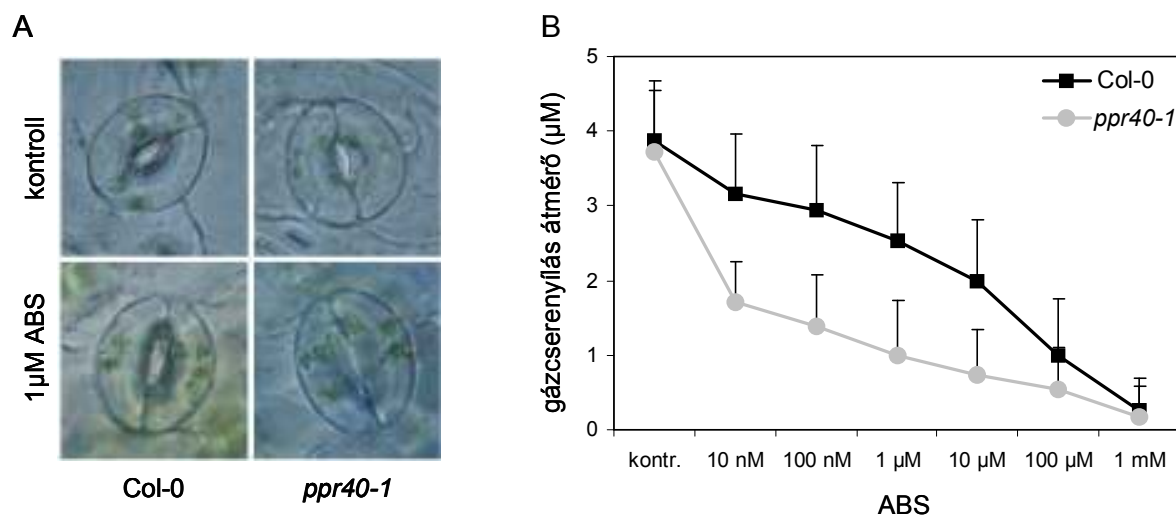
Col/BC7: PPR-HA túlermelző növény, Col-0: vad típus

5.5. A *ppr40-1* ABS érzékenységeinek következményei

5.5.1. A PPR40 fehérje befolyásolja a sztómamozgást

Az ABS fiziológiai hatásai szerteágazóak lehetnek: szabályozza a levelek leválását, hatással van a rügyek és magvak nyugalmi állapotának kialakulására és megszűnésére, serkenti a járulékos gyöckerképződést és az öregedés folyamatát, gátolja a megnyúlásos növekedést, szerepe van a sztómamozgásban és a vízvesztés szabályozásában, a hideg-, só- és szárazságstresszre adott válaszreakciók indukciójában. Az egyik legjellemzőbb ABS által szabályozott válasz a sztómazáródás folyamata vízhiány hatására. Szerettük volna összehasonlítani az ABS indukálta sztómazáródást a vad és *ppr40-1* növényekben, ezért leveleikről epidermisz nyúzatot készítettünk, és különböző koncentrációjú ABS oldatban

nyomon követtük a pórusátmérőben bekövetkező változásokat. Míg a kezeletlen vad és *ppr40-1* növények nem mutattak jelentős különbséget, a *ppr40-1* mutáns a növekvő ABS koncentrációkra szignifikánsan erősebben megnyilvánuló sztómazáródással reagált (5.13. ábra).



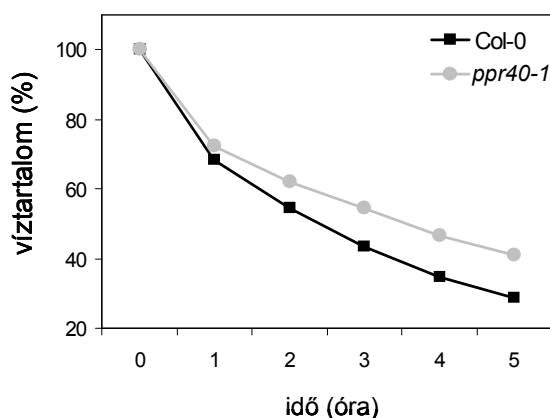
5.13. ábra ABS hatása *ppr40-1* és Col-0 sztómamozgására

A: 1 μM ABS hatására a *ppr40-1* jobban zárja a gázcsere nyílásait

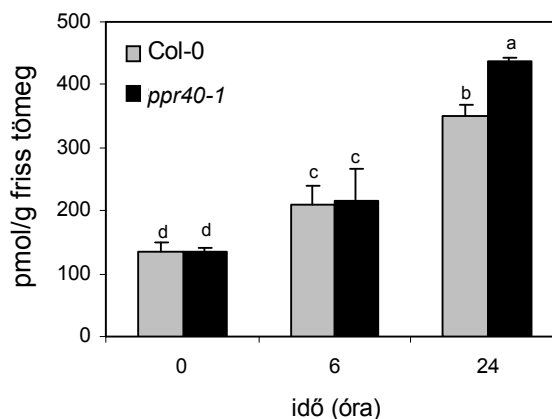
B: Növekvő ABS koncentráción a *ppr40-1* és a Col-0 közötti sztóma záródási különbség ($p < 0.001$, $n = 80$)

A sztómák nyitottsága befolyásolja a párologtatás mértékét, ezért megvizsgáltuk a *ppr40-1* és Col-0 levágott leveleinek vízvesztését szobahőmérsékleten szárítva azokat. A levágott *ppr40-1* levél vízvesztése szignifikánsan kisebb volt mint a vad típusúé (5.14. ábra), és ez a különbség összefüggésbe hozható a *ppr40-1* mutáns sztómazáródásának megnövekedett ABS érzékenységgel.

Annak eldöntésére, hogy a *ppr40-1* fokozott ABS érzékenysége oka a hormon bioszintézisében bekövetkezett változás miatti megemelkedett ABS szint, vagy a jelátviteli útvonal sérült meg, megmértük a mutáns és vad növények szabad ABS tartalmát.



5.14. ábra A *ppr40-1* és Col-0 növények levágott leveleinek vízvesztése ($p < 0.001$, $n = 50$)



5.15. ábra A *ppr40-1* és Col-0 növények endogén ABS tartalma

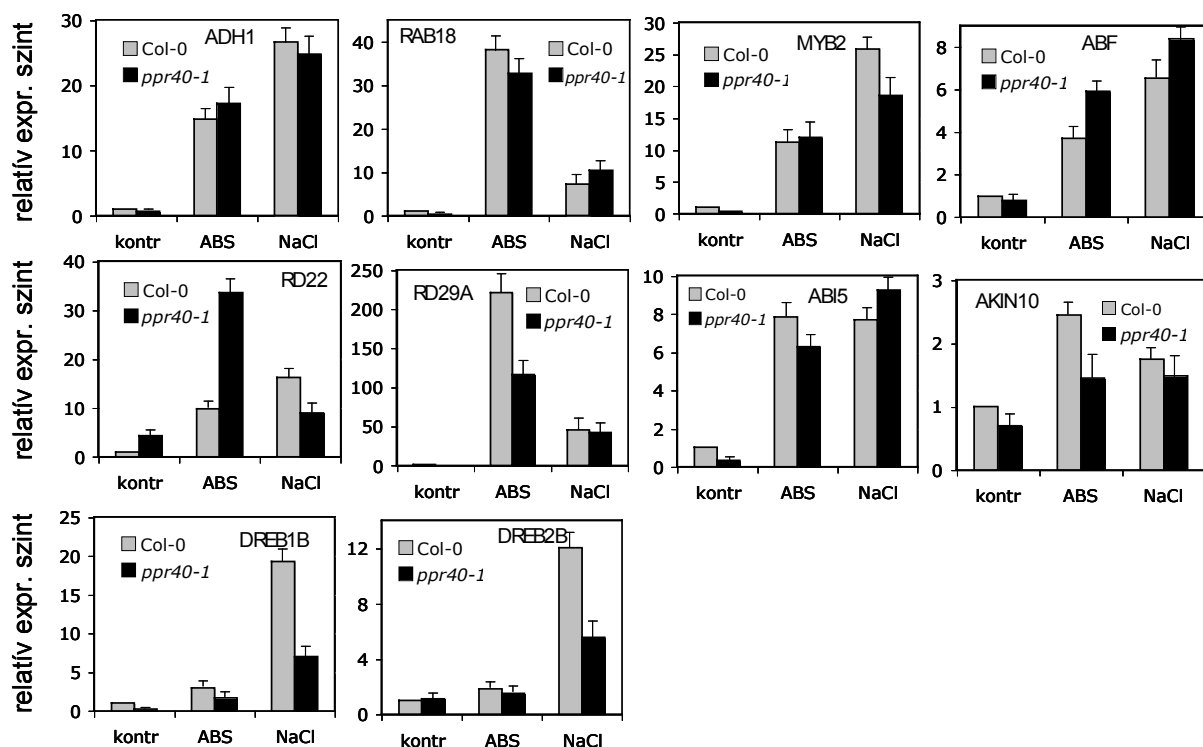
3 hetes növények 0, 6 és 24 órás 150 mM NaCl kezelés után ($p < 0.02$)

6 és 24 órán keresztül 150 mM NaCl kezelésnek tettünk ki három hetes csíranövényeket 1/2MS kontroll alkalmazása mellett (0 időpont). Az ABS szint megegyezett a két növényben kontroll és 6 óra só kezelése hatására (5.15. ábra), és mint ahogy az várható volt, a stressz következtében megnőtt a szabad ABS tartalom a növényekben. A 24 órás só kezelés tovább növelte az ABS koncentrációt (*ppr40-1*-nél 3.2-szeres, Col-0-nál 2.5-szörös a kontrollhoz képest), és enyhe különbséget eredményezett a vad és a mutáns között. A megfigyeléseinkből arra következtettünk, hogy a *ppr40-1* mutánsban a megemelkedett endogén ABS szint a sóstressz alatt hozzájárult a stresszérzékenység fokozódásához. A fenti eredményeink arra utalnak, hogy nem a bioszintézis, hanem az ABS jelátviteli út érintett a mutáció által.

5.5.2. A PPR40 szerepe a stresszindukált jelátviteli utakban

A *ppr40-1* fokozott ABS és só érzékenységből kiindulva arra kerestük a választ, hogy az ABS-függő és ABS-független jelátviteli utakban ozmotikus stresszt hatására aktiválódó gének (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 2005) kifejeződése megváltozik-e a mutánsban. Valós-idejű RT-PCR kísérleteket végeztünk (5.16. ábra), és azt tapasztaltuk, hogy az ADH1 és RAB18 transzkript szintje hasonló volt a vad és a *ppr40-1* növényekben. Az RD22 esetében nagyobb, míg az RD29-nél kisebb expressziós szintet mértünk ABS kezelés hatására a mutánsban a vadhoz képest. A DREB1B és DREB2B transzkripciós faktorok mRNS szintjei kezelés nélkül és ABS hatására hasonlóak voltak, míg a NaCl kezelés következtében kisebb

mértékben emelkedett a mennyiségük a *ppr40-1* mutánsban. Az ABF transzkripciós faktor mRNS szintje ABA és só hatására is megemelkedett a *ppr40-1* növényekben. Az *AKIN10* SnRK1 α kináz expressziós szintje az ABS indukció hatására kisebb lett a *ppr40-1* mutánsban, de a sejtmag specifikus ABI5 transzkripciós faktor mRNS szintje nem mutatott lényegi eltérést a vad növényekéhez képest. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PPR40-nak nincs közvetlen hatása sem az ABS szintézisre, sem a jelátviteli folyamatok elsődleges irányítására, bár a *ppr40-1* mutáció közvetetten befolyásolta ezeket a folyamatokat.



5.16. ábra Stresszindukált gének kifejeződésének vizsgálata vad és *ppr40-1* mutáns növényekben

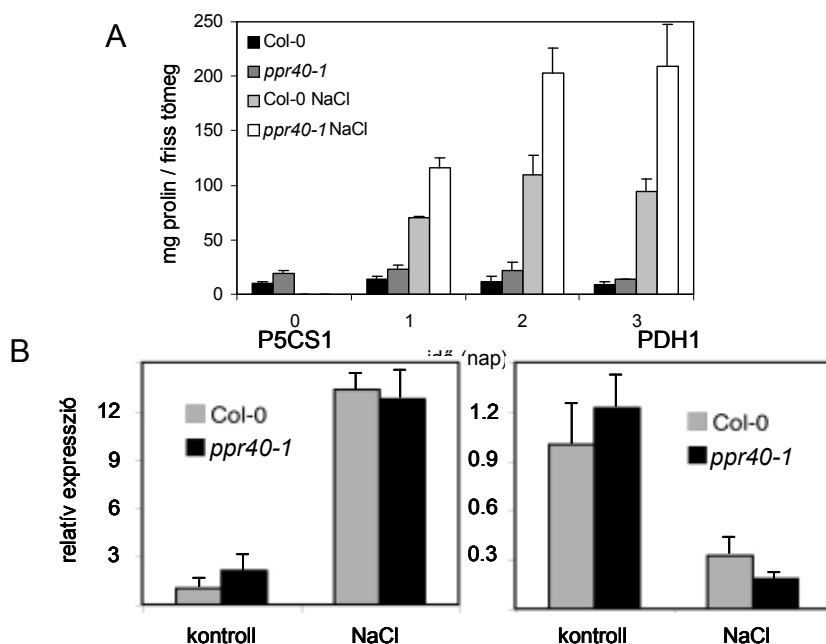
A valós idejű RT-PCR kísérleteknél három hetes csíranövényeket használtunk 6 óra 50 μ M abszizinsav (ABS) és 6 óra 150 mM NaCl (NaCl) kezelések után, kezeletlen (kontr.) minták mellett. Referencia gén: GAPDH-2.

5.5.3 Prolin felhalmozódás a *ppr40-1* mutánsban

Az ozmotikus stressz, illetve az általuk kiváltott vízhiány okozta károsodást a növények többféle úton is elkerülhetik. Az egyik mechanizmus során ozmoprotektáns anyagok halmozódnak fel. Ilyenek például a prolin, glicin-betain, glicerol, metilált inozitok, különböző cukrok (raffinóz, trehalóz, fruktóz származékai) (Yokoi és mtsai., 2002). Mivel a *ppr40-1* mutáns a vad fenotípusú növényekhez képest megváltozott módon reagált sóstresszre, megvizsgáltuk a szabad prolin felhalmozódásának folyamatát 150 mM NaCl

indukció hatására. Három napos sókezelés hatására a *ppr40-1* növényekből már az első naptól kezdve legalább kétszer annyi prolint tudtunk kimutatni, mint a vad növényekből (5.17. A ábra), és a kezeletlen kontroll minták között is megfigyelhető volt ez különbség.

Növényekben a prolin akkumulációját a bioszintézis útja és a lebontási folyamatok ellentétesen bár, de egyaránt befolyásolják, ezért valós-idejű RT-PCR segítségével megvizsgáltunk a szintézis és a lebontási folyamat egy-egy kulcsenzimének a kifejeződését. A *P5CS1* (Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz 1) enzim a szintézisben, míg *PDH1* (prolin-dehidrogenáz 1) a lebontásban vesz részt. A *P5CS1* mRNS szintje kétszer magasabb volt a *ppr40-1* növényekben kontroll körülmények között, míg a 6 órás NaCl indukció hatására a jelentős megemelkedésen túl nem tapasztaltunk különbséget a *P5CS1* expressziós szintjei között. A *PDH1* esetében a kezeletlen mintáknál volt közel azonos a kifejeződés mértéke, míg a sóstressz hatására 50%-kal erősebb csökkenést mértünk a *ppr40-1* mutánsban (5.17. B ábra). Habár a *PDH1* csökkenése összefüggésben van a sóstressz okozta prolin felhalmozódással a *ppr40-1* növényekben, nincs különbség a *P5CS1* transzkript mennyiségében a vad és a mutáns között NaCl indukció hatására.



5.17. ábra Prolin felhalmozódása és bioszintézisének enzimei a *ppr40-1* mutánsban

A: Két hetes *ppr40-1* és Col-0 csíranövények szabad prolin tartalma 3 napig tartó 150 mM NaCl kezelés alatt. Kontr: kezeletlen kontroll, NaCl: 150 mM NaCl kezelés.

B: A *P5CS1* és *PDH1* gének expressziójának változása 6 óra 150 mM NaCl indukció hatására valós idejű RT-PCR-rel vizsgálva

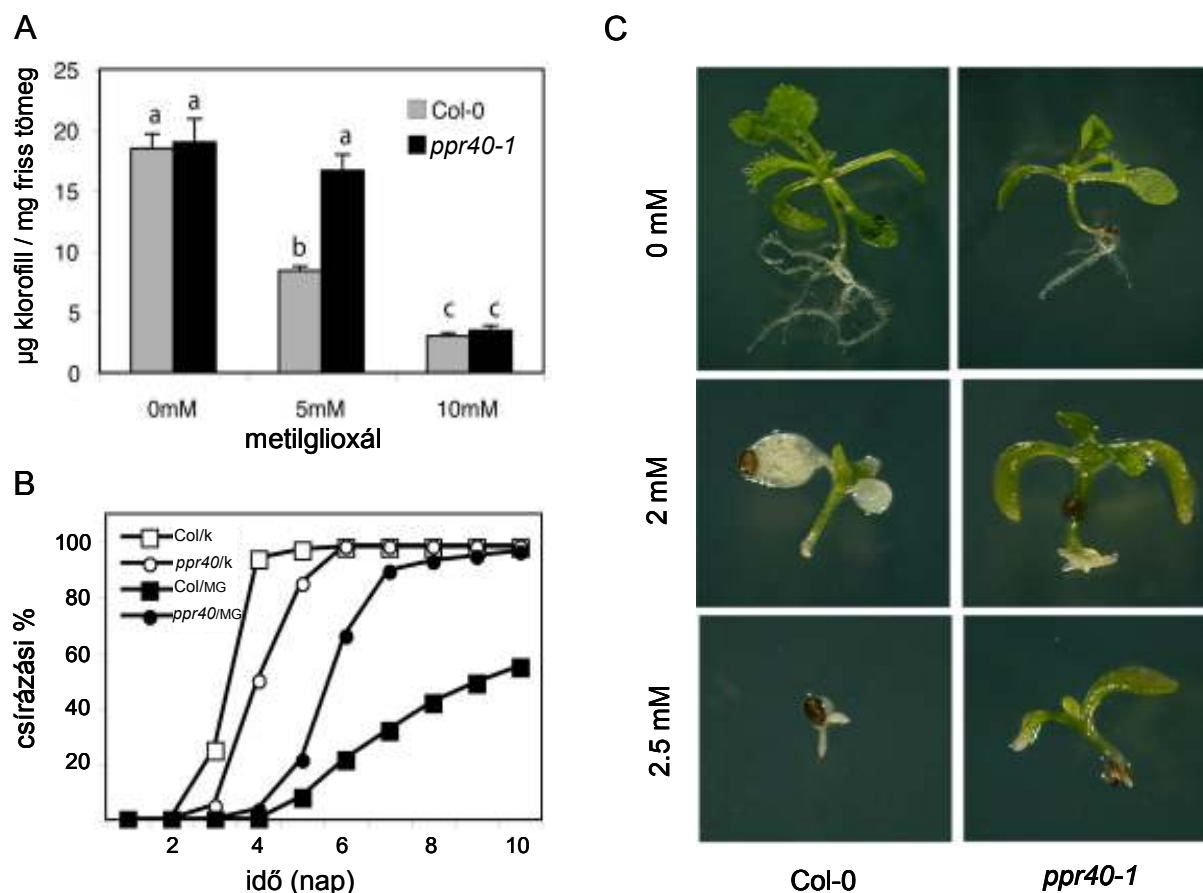
5.6. A *ppr40-1* mutáns toleráns a metilglioxál toxikus hatására

A metilglioxál (MG) természetes körülmények között elsősorban a szénhidrát és aminosav anyagcsere mellékterméke. Gátolja a glikolízist és a mitokondriális légzési lánc működését, hatására lecsökken a sejten belüli ATP mennyisége és növényekben megindul a klorofill molekulák lebomlása. Mivel a vegyület egyik elsődleges támadási pontja a sejten belül a mitokondrium, kíváncsiak voltunk rá, hogy a *ppr40* mutáció befolyásolja-e a hatását. Vad típusú és *ppr40-1* magokat csíráztattunk ki különböző koncentrációjú MG jelenlétében, és azt figyelhettük meg, hogy 2 mM MG a *ppr40-1* mutáns csírázását másfél-két nappal késleltette, míg a vad növényeknél 6-7 nap eltolódást tapasztaltunk a kontroll körülményekhez képest. 2.5 mM MG mellett a vad növények gyakorlatilag már képtelenek voltak kicsírázni, ezzel szemben a *ppr40-1* növények számára ez a koncentráció még elviselhető volt, és bár gyökérük nem, de zöld sziklevelük és levélkezdeményük fejlődött. 2 mM MG tartalmú táptalajon a vad csíranövényeknek nem nőtt gyökérük és teljesen kifehéredtek, amíg a *ppr40-1* mutánsok rövid gyökerű és normális zöld levelű kis növényekké fejlődtek (5.18. B és C ábra). Még 3.5 mM MG mellett is képesek voltak a *ppr40-1* növények 10 nap alatt kicsírázni.

Klorofill-tartalom (klorofill-a + klorofill-b) mérésakor nem tapasztaltunk különbséget a három hetes vad és a *ppr40-1* között a kezeletlen mintáknál. 2 nap 5 mM MG kezelés hatására azonban a vad növényekben drámaian lecsökkent a klorofill mennyisége (50%-kal), míg a *ppr40-1* mutánsokban nem változott (5.18.A ábra). 10 mM illetve az annál nagyobb koncentrációjú MG jelenléte már mindkettő számára letális volt, és a visszafordíthatatlan károsodás következtében a növények teljesen kifehéredtek és elpusztultak.

A metilglioxál lebontását a glioxaláz út enzimei végzik, ami a növények esetében a glioxaláz I (laktoil-glutation liáz) és a glioxaláz II (hidroxiacil-glutation hidroláz) enzimeket foglalja magába. *Arabidopsis*-ban eddig 7 glioxaláz I-et és 5 glioxaláz II-t azonosítottak, de csupán ötöt jellemeztek eddig bővebben (GLX1-1, GLX2-1, GLX2-2, GLX2-3, GLX2-5). Az egyes glioxaláz gének eltérő expressziós mintázatot mutatnak különböző indukciós kezelésekre (<https://www.genevestigator.ethz.ch>, Zimmermann és mtsai., 2004), amiből arra lehet következtetni, hogy a működésük egymástól eltérő módon szabályozódik. A glioxaláz I és II gének túltermeltetésével növelni tudták a MG-lal szembeni ellenállóképességet a lebontási folyamatok fokozása által (Singla-Pareek és mtsai., 2003). Ebből következik, hogy a glioxaláz gének transzkripciós kontrollja fontos a MG detoxifikáció megfelelő

szabályozásához. Szerettük volna megtudni, hogy a *prr40-1* mutáció okoz-e bármilyen



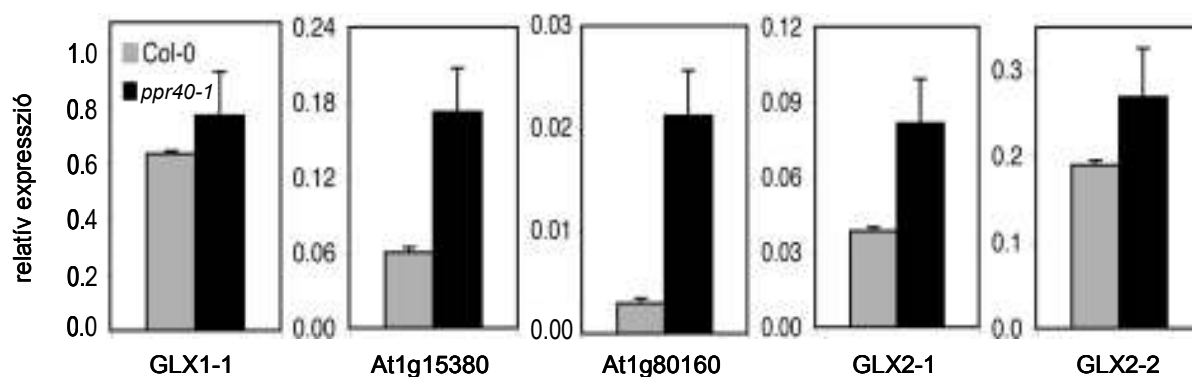
5.18.ábra A *prr40-1* mutáns toleráns a metilglioxál kezeléssel szemben

A: Klorofill-a és -b tartalom mérése 3 hetes *prr40-1* és vad (Col-0) növényekben 2 nap 0, 5 és 10 mM MG kezelés után ($p < 0,001$)

B: MG hatása a vad (Col) és *prr40-1* csírázására. k- kontroll, MG- 2 mM metilglioxál

C: 0, 2 és 2.5 mM MG jelenlétében csíráztatott két hetes Col-0 és *prr40-1* növények

változást a glioxaláz gének szabályozásában, ezért megvizsgáltuk néhány *GLX1* és *GLX2* gén kifejeződését vad és *prr40-1* növényekben. Általános növekedési feltételek mellett a *GLX1-1* (*At1g11840*) gén expressziója közel azonos mértékű volt a vad és a *prr40-1* növényekben, ellentétben a másik két általunk vizsgált glioxaláz I génnel, ahol az *At1g15380* expressziója háromszor, az *At1g80160* expressziója pedig nyolcszor magasabb volt a *prr40-1* mutánsokban a vadhoz képest. A *GLX2-1* (*At2g43430*) és *GLX2-2* (*At3g10850*) transzkript szintje szintén 1.5-2-szer magasabb volt a mutánsban (5.19. ábra). A vizsgált glioxaláz gének megemelkedett expressziója magyarázhatja a *prr40-1* mutáns MG szembeni rezisztenciáját.



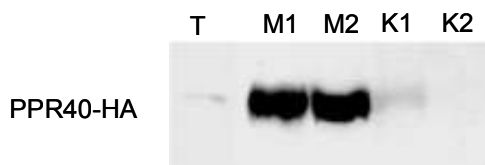
5.19. ábra A glioxaláz I és glioxaláz II gének transzkripciós aktivitása vad és *ppr40-1* mutáns növényekben. Alap állapotú transzkript szintek vizsgálata valós-idejű RT-PCR-rel: *GLX1-1* (*At1g11840*), *At1g15380*, *At1g80160*, *GLX2-1* (*At2g43430*), *GLX2-2* (*At3g10850*). A relatív expresszió mértékét a *GAPDH-2* referencia génhez viszonyítottuk.

5.7. A PPR40 fehérje kapcsolata a mitokondriális elektron transzporttal

5.7.1. A PPR40 fehérje lokalizációja

A PPR domént tartalmazó fehérjecsalád tagjai jórészt a kloroplasztiszokban vagy a mitokondriumokban lokalizálódnak, és a sejtorganellumokon belüli génexpressziós folyamatok szabályozásában vesznek részt (Andrés és mtsai., 2007). Mivel a PPR40 fehérje sejten belüli eloszlásáról nem közöltek még az irodalomban kísérletes adatot, ezért először számítógépes programokkal elemeztük a lehetséges lokalizációt. A TargetP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) elemzése alapján a fehérje valószínűleg a kloroplasztiszban lokalizálódik, míg a Predotar (<http://urgi.infobiogen.fr/predotar/>) és az iPSORT algoritmus (<http://psort.nibb.ac.jp/>) a mitokondriumban valószínűsítette a fehérje működési helyét. Ezekből a feltételezésekből kiindulva a PPR40 aminosav szekvenciájának vizsgálata alapján mi egy mitokondriális célszekvenciát és hasító helyet azonosítottunk a fehérje aminoterminális részén (5.3.C ábra). A PPR40 sejten belüli lokalizációjának igazolásához vad és PPR40-HA fehérjét túltermelő növényeket felhasználva fehérjét izoláltunk különböző sejtszervecskéből és teljes sejt kivonatból. Annak ellenére, hogy a PPR40-HA mRNS szintje a túltermelő növényekben magas volt, teljes sejt kivonatból alig tudtuk kimutatni a fehérjét Western blot analízisben. Sejtszervecskék izolálása után a PPR40-

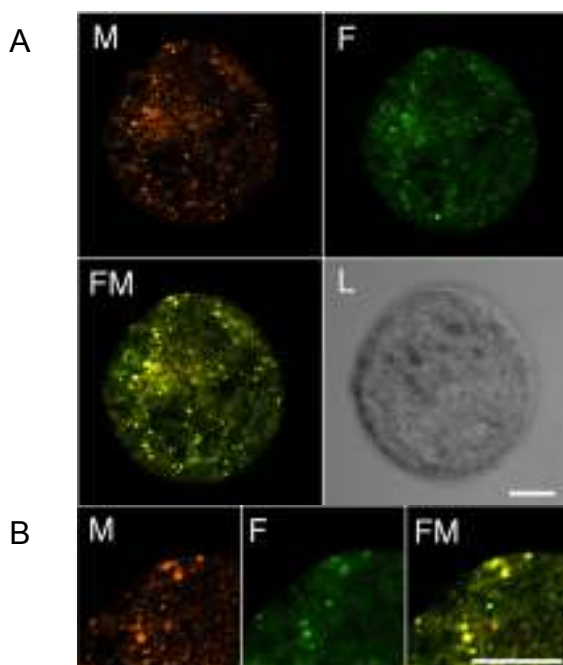
HA fehérje a mitokondriumban volt kimutatható HA ellenanyag segítségével (5.20. ábra). Sem kloroplasztiszban, sem más organelumban nem mutattunk ki fúziós fehérjét.



5.20. ábra PPR40-HA fúziós fehérje Western blot analízise

T: teljes sejtkivonat. Az M1 és M2: mitokondriális frakciók, K1 és K2: kloroplasztisz frakciók két független transzgenikus vonalból

Az immunoblot eredmények alátámasztásához megvizsgáltuk a PPR40-HA sejten belüli térbeli eloszlását fluoreszcensen jelölt HA ellenanyag segítségével. PPR40-HA fehérjét túltermelő gyökér eredetű sejtuszuspenziós kultúrát hoztunk létre *Agrobacterium*-közvetített transzformáció segítségével, majd protoplasztokat izoláltunk belőle és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk egér monoklonális HA ellenanyag és FITC-kapcsolt kecske egér-elleni IgG felhasználásával. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével készített felvételeken jól látható, hogy a zöld színben fluoreszkáló FITC-jelölt HA ellenanyag és a narancssárga színben fluoreszkáló MitoTracker mitokondriális marker jele átfed egymással (5.21. A ábra).



5.21. ábra PPR40-HA túltermelő protoplaszt immunfestése

A: M - MitoTracker Orange fluoreszcens jele, F - FITC-jelölt HA-elleni ellenanyag zöld fluoreszcens jele, FM - FITC és MitoTracker átfedő jele, L - a protoplaszt áteső fehér fényben. A vonal 5 µm mutat.

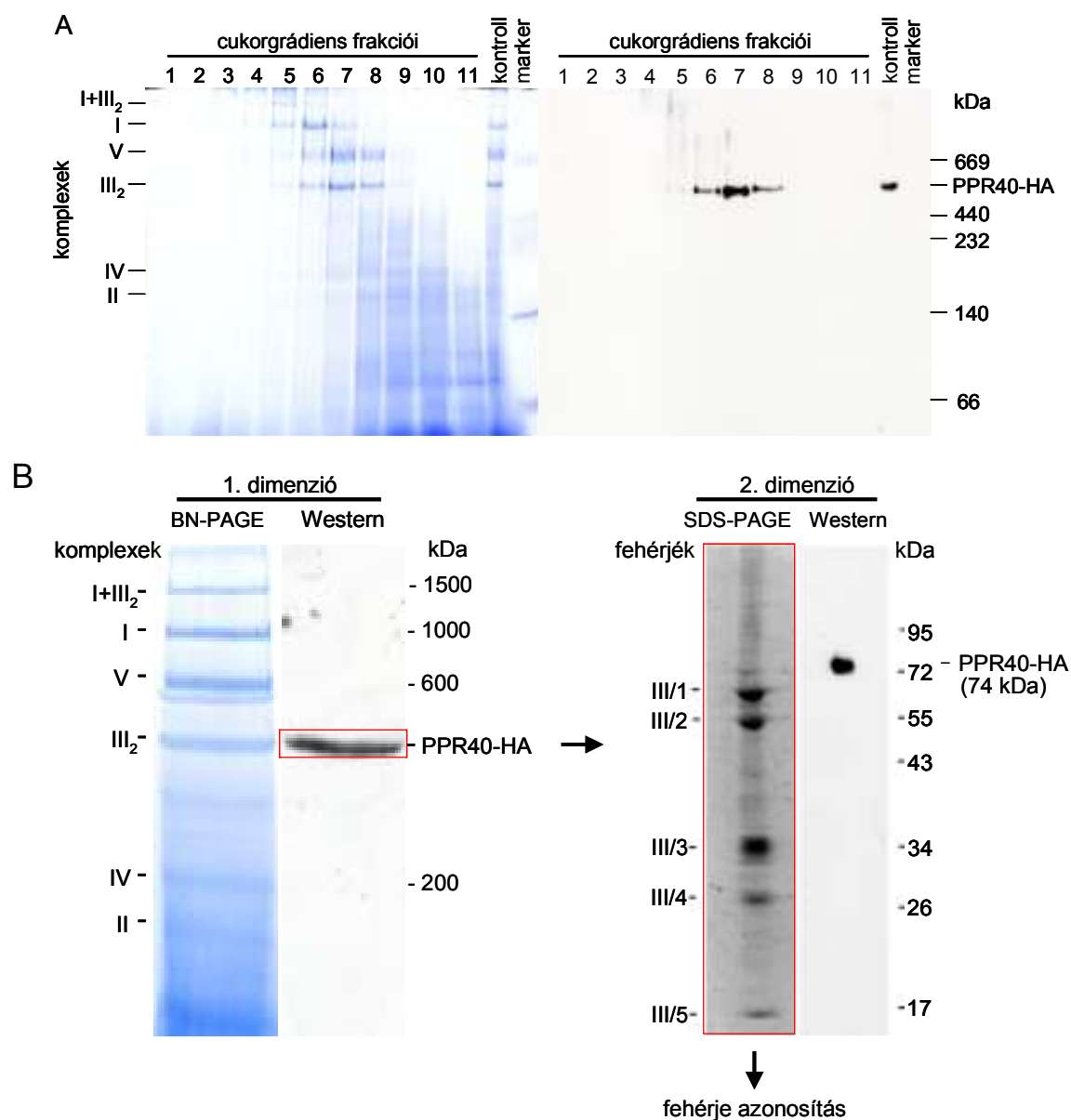
B: Nagyfelbontású felvétel MitoTracker, FITC és átfedő (sárga fluoreszcens) jelről, a vonal 5 µm mutat.

A nagyobb felbontású felvételek megerősítették a két jel teljes átfedését, ami alátámasztja a PPR40 fehérje mitokondriális elhelyezkedését (5.21. B ábra).

5.7.2. A PPR40 kapcsolódása a III komplexhez

A PPR40 mitokondriális lokalizációja arra ösztönzött minket, hogy tanulmányozzuk a fehérje organelumon belüli szerepét és esetleges kapcsolatát a makromolekuláris komplexekhez. Első lépésként a fehérje RNS kötő képességét vizsgáltuk meg, mivel ez az eddig ismert PPR domént tartalmazó fehérjék nagy részére jellemző tulajdonság. Több különböző módszert alkalmaztunk: UV és formaldehid keresztkötő ágensek segítségével mitokondriális fehérje-RNS komplexeket hoztunk létre, tisztított PPR40 fehérjével RNS-kötési gél retardációs technikát alkalmaztunk, illetve *in vitro* transzlált mitokondriális RNS-eket használtunk. Egyik esetben sem találtunk egyértelmű bizonyítékot arra, hogy a PPR40 RNS kötésre képes. Ezek után megpróbáltuk a PPR40 fehérjének a pontos helyzetét meghatározni a mitokondriumon belül. Mivel egy előző kísérletben azt találtuk, hogy a fehérje membrán asszociált, ezért két különböző módszert, a mitokondriális fehérje komplexek cukorgrádiensen történő elválasztását és az ún. 2 dimenziós Blue-Nativ/SDS poliakrilamid gélelektroforézist (BN/SDS PAGE) alkalmaztuk. E két módszerrel, illetve az ezeket követő western analízissel arra kerestük a választ, hogy a PPR40-HA fehérje kapcsolódik-e valamelyik légzési komplexhez a mitokondriumban.

A komplexek cukorgradiens centrifugálással történő elválasztása után a kapott frakciókat BN-PAGE-al, és HA-elleni ellenanyagot használva western analízissel vizsgáltuk meg (5.22. A ábra). A PPR40-HA fehérje egy kb. 500 kDa tömegű komplexben volt kimutatható a 6-8 frakciókból. A komplex mérete megegyezett a mitokondriális légzési lánc III komplexének méretével (Dudkina és mtsai., 2005). Ezzel párhuzamosan végeztük 2 dimenziós Blue-Nativ/SDS poliakrilamid gélelektroforézis kísérleteket. A 2D BN/SDS PAGE technika lényege, hogy első lépésként (első dimenzió) a biológiai membránokhoz kötött fehérje komplexeket elválasztjuk molekulatömegük szerint natív körülmények között. Második lépésként (második dimenzió) a komplexeket alkotóikra bontjuk denaturáló körülmények között. A PPR40-HA túltermelő sejtszuspenziós kultúrából mitokondriumot izoláltunk, majd BN-PAGE-el elválasztottuk és coomassie festéssel láthatóvá tettük az elektron transzport lánc komplexeit (5.22. B ábra). Western detekciót követően azt tapasztaltuk, hogy a PPR40-HA fehérje feltételezhetően a III komplexhez kapcsolódik. Ennek alátámasztására a PPR40-HA fehérjét tartalmazó komplexet a natív gélből kivágtuk, és SDS-



5.22. ábra PPR40-HA fehérje a mitokondriális elektron transzport lánc III komplexéhez kapcsolódik

A: Cukorgrádiens centrifugálással elválasztott frakciók szeparálása blue-natív gélelektroforézissel (bal oldal), illetve az azt követő western analízis (jobb oldal). Kontroll: natív körülmények között izolált mitokondriális fehérje kivonat.

B: A BN-PAGE elválasztott mitokondriális komplexekben Western analízissel azonosítottuk a PPR40-HA fehérjét, ami a III komplexhez köthető. A III komplex 2. dimenziós elválasztását SDS-PAGE-el végeztük, majd Western analízissel megerősítettük a PPR40-HA jelenlétét a komplex tagjai között. A III komplex alegységeit (III/1-5) tömegspektroszkópiás analízissel azonosították (5.1. táblázat).

PAGE-el alkotóira bontottuk. Egy újabb western analízissel sikerült megerősíteni a 74 kDa molekulatömegű PPR40-HA fehérje jelenlétét az adott komplexben. A komplex azonosításához öt, viszonylag nagy mennyiségben előforduló alegységet tömegspektroszkópiás analízissel elemeztünk (5.1. táblázat). Az összes azonosított fehérje a

mitokondrium III komplex már ismert alegysége volt. Az eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a PPR40 fehérje a III komplexhez kapcsolódva a mitokondriális elektron transzport lánc része.

minta	gén	fehérje	tömege (kDa)	egyedi peptidek	lefedettség
1	At3g02090	mitochondrial-processing peptidase β subunit	59	32	55.0%
1	At3g16480	mitochondrial-processing peptidase α -2 subunit	54	1 ^a	3.0%
1	At2g07727	Cytochrome b	44.5	1 ^b	3.3%
2	At1g51980	mitochondrial-processing peptidase α -1 subunit	54 ^c	24	40.4%
2	At3g16480	mitochondrial-processing peptidase α -2 subunit	54 ^c	1 ^c (9)	16.4%
3	At5g40810	Cytochrome c 1	33	6	20.8%
4	At5g13430	Ubiquinol-cytochrome c reductase (REISKE subunit)	26	6	22.1%
5	At4g32470	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein	14.5 ^d	5	49.2%
5	At5g25450	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein	14.6 ^d	1 ^d (2)	18.0%

5.1. táblázat A PPR40-HA fehérjét tartalmazó mitokondriális komplexből azonosított fehérjék listája

A listában szereplő összes fehérje a mitokondrium III komplex részét képezi.

^a EIEAIGGNTSASASR, ^b GIPNSYTDDETHT

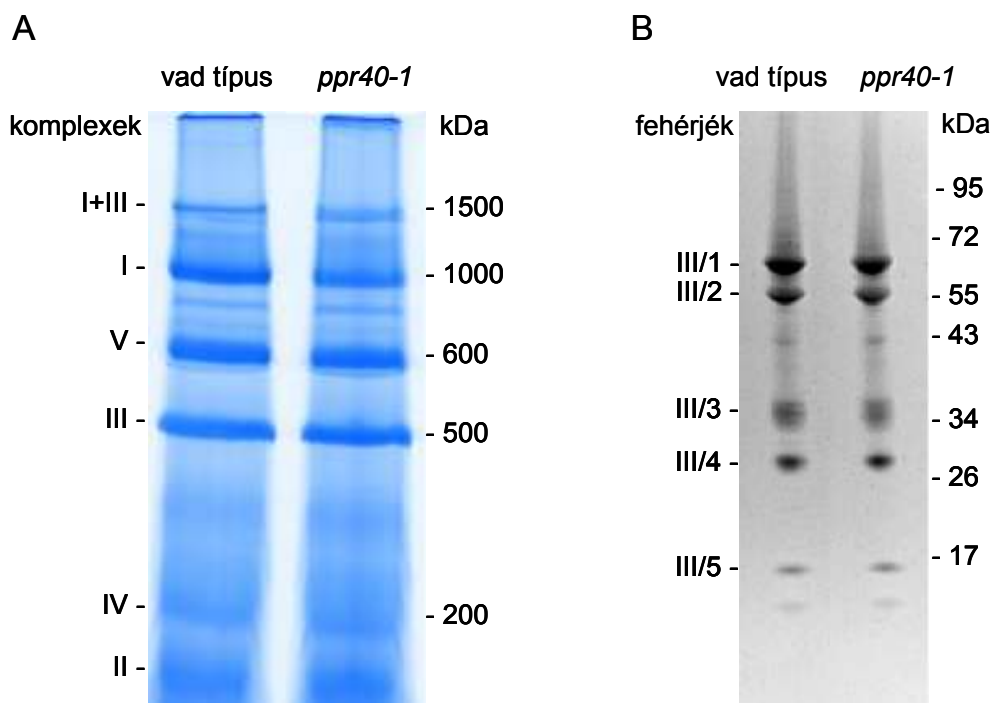
^c Ezek a fehérjék 81%-ban azonosak, ám volt egy egyedi peptid (SAILmNLESR), ami alapján az α -2 alegység azonosítva lett.

^d Ezek a fehérjék 81%-ban azonosak, viszont volt egy egyedi peptid (SYLQDmLALVK), ami alapján azonosítani lehetett a második fehérjét is.

5.7.3. A *ppr40-1* és vad típus mitokondriális komplexeinek összehasonlítása

Azért, hogy teszteljük, hogy a PPR40 fehérje hiánya okozott-e bármilyen változást az elektronszállítási komplexumok összetételében, mitokondriumot izoláltunk vad és *ppr40-1* mutáns sejtszuszpenziós kultúrából, és a membránfehérjéket BN gélen elválasztottuk. A vad és mutáns mitokondriumok légzési komplexei hasonlóan néztek ki a BN gél futási képén (5.23. A ábra), és ImageJ program segítségével történő képelemzés eredménye (függelék, 12.2. A ábra) is ezt igazolta. A *ppr40-1* és vad III komplex SDS-PAGE elválasztása után (5.23. B) szintén nem találtunk mennyiségi különbséget az egyes komplex alkotó alegységek ImageJ-vel történő elemzése után (függelék, 12.2. B ábra). Habár a PPR40 egyértelműen a III komplexhez kapcsolódik, ezek az adatok azt mutatták, hogy a PPR40 fehérje valószínűleg nem hat a III komplex főbb alegységeinek összetételére és stabilitására. Valós idejű RT-PCR-

rel megvizsgálva a III komplex génjeinek mRNS szintjét azt tapasztaltuk, hogy a vad és a *ppr40-1* növények között egyik esetben sem volt 50%-nál nagyobb a különbség (5.2. táblázat), és a transzkript szintek jórészt megegyeztek.



5.23. ábra *ppr40-1* mutáns és vad típusú mitokondrium légzési komplexeinek összehasonlítása BN/SDS-PAGE analízissel

A: BN-PAGE elválasztás sejtszuszpenzióból izolált mitokondriumokból

B: *ppr40-1* és vad típusú III komplex SDS-PAGE analízise

gén	fehérje	vad típus	<i>ppr40-1</i>	<i>ppr40/vad tp.</i>
At3g27240.1	CYC1-1	0,148 ± 0,002	0,121 ± 0,001	0,82
At5g40810.1	CYC1-2	7,24 ± 0,06	7,26 ± 0,07	1,00
At1g51980.1	MPPα1	36,6 ± 3,37	33,6 ± 1,7	0,92
At3g16480.1	MPPα2	0,712 ± 0,01	0,856 ± 0,01	1,20
At3g02090.1	MPPβ	3,2 ± 0,03	2,66 ± 0,07	0,83
At2g40765.1	UCRY	6,5 ± 0,02	6,32 ± 0,49	0,97
At5g13430.1	UCR1-1	4,69 ± 0,09	5,24 ± 0,09	1,12
At5g13440.1	UCR1-2	0,44 ± 0,005	0,57 ± 0,05	1,28
At3g10860.1	UCRQ-1	0,68 ± 0,03	0,80 ± 0,001	1,19
At5g05370.1	UCRQ-2	6,78 ± 1,43	5,92 ± 0,4	0,87
At1g15120.1	QCR6-1	1,58 ± 0,03	1,57 ± 0,02	0,99
At2g01090.1	QCR6-2	1,8 ± 0,01	1,52 ± 0,09	0,84
At4g32470.1	QCR7-1	281 ± 3,68	193 ± 5,76	0,69
At5g25450.1	QCR7-2	1,23 ± 0,02	1,1 ± 0,01	0,89
At3g52730.1	QCR9	11,8 ± 0,01	10,8 ± 0,48	0,92
At2g07727.1	COB2	465 ± 113	476 ± 119	1,02
At2g07727.1 és AtMg00220	COB2 és cob	22,7 ± 1,87	36,4 ± 0,83	1,60

5.2. táblázat A III komplex alegységeinek expressziós analízise valós idejű RT-PCR segítségével

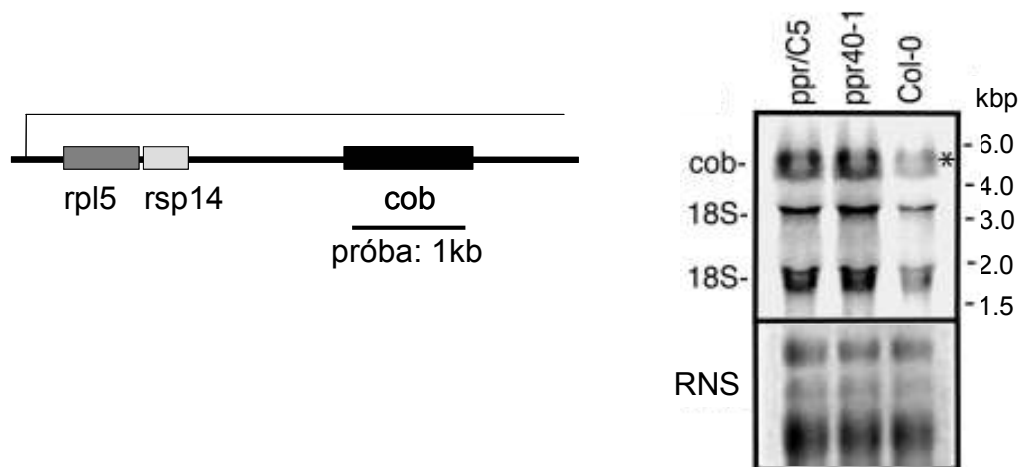
Három hetes vad és *ppr40-1* növényeken végeztük a vizsgálatokat GAPDH-2 kontroll gén transzkript szintjéhez normalizálva az eredményeket, melyek 10^3 -szorosát tüntettük fel a táblázatban.

5.7.4. A PPR40 lehetséges szerepe a mitokondriális RNS érési folyamataiban

A PPR fehérjék nagy számban vesznek részt az organelláris RNS érési folyamatok szabályozásában, ezért megvizsgáltuk, hogy a PPR40 befolyásolja-e a III komplex alegységeinek mRNS érését. Az apocitokrómban (*cob*, *ATMG00220*) az egyetlen III komplex alegység, ami a mitokondriális genomon kódolódik, és egy 5 kb hosszúságú transzkriptként íródik át (Brandt és mtsai., 1993). Ez a transzkript tartalmazza még az L5 riboszómális fehérje génjét (*rpl5*) és egy, a S14 riboszómális fehérje génjéhez (*rsp14*) hasonló pszeudogént. Az összes többi III komplex alegység a sejtmag genomjában kódolódik és az érett fehérjék szállítódnak a mitokondriumba.

Az apocitokrómban a gén nem tartalmaz intront, de mivel az *rpl5*-el és *rsp14*-el egy leolvasási keretet alkotnak, Northern hibridizációt alkalmazva transzkript analízist végeztünk. *ppr40-1* mutáns, vad típusú és komplementált (*ppr/C5*) növényekből teljes mitokondriális RNS-t tisztítottunk, majd 1 kb hosszúságú *cob* próbát használtunk (4.5. fejezet). A hibridizáció eredménye (5.24. ábra) alapján kijelenthetjük, hogy az *rpl5-rps14*-

cob transzkriptum méretében nincs különbség a *prr40-1* mutáns, vad típusú és komplementált (*prr/C5*) növények között.



5.24. ábra Az apocitokrómban *cob* gén Northern analízise

Az apocitokrómban (*cob*) próbával egy 5 kb-os átírt mRNS detektálható (* jelölt), ami a *rpl5-rps14-cob* transzkriptum. A kisebb hibridizációs jelek a 18S rRNS kereszt-hibridizációjából adódnak (Brandt et al., 1993). Az alsó panelen a gélre felvitt etidium-bromiddal festett RNS minták láthatóak.

Az RNS szerkesztés folyamán bekövetkező hibák befolyásolhatják a fehérjék létrejöttét és aktivitását. Az apocitokrómban mRNS érének vizsgálatakor hét szerkesztési helyet (C→U konverzió) azonosítottak (Giegé és Brennicke, 1999). Szerettük volna megtudni, hogy a *cob* mRNS szerkesztése megváltozott-e a *prr40-1* mutánsban, ezért vad típusú és mutáns növényekből tisztított mitokondriális RNS mintákból teljes hosszúságú *cob* cDNS-t írtunk át, és meghatároztuk a nukleotid sorrendjét. Összehasonlító szekvencia analízissel azonosítani tudtuk mind a hét ismert C→U szerkesztési helyet (5.25. ábra), és nem találtunk semmilyen különbséget a vad és a mutáns növény *cob* cDNS szekvenciája esetében.

Bár nem találtuk eltérést a *prr40-1* és vad típusú növények között az egyetlen mitokondriumban kódolt III komplex alegység RNS vágási és szerkesztési folyamataiban, nem zárható ki a PPR40 a fent említettektől különböző szerepe a mitokondriális RNS metabolizmus szabályozásában (pl.: sapkázódás, metilációk; transzláció szabályozása).

prr40-cob	GGGGCAAGTATGTTTTTTATTGTGGTTTAC	
Col-cob	GGGGCAAGTATGTTTTTTATTGTGGTTTAC	
cob-genomi	GGGGCAAGTATGTTTTTTATTGTGGTTTAC	271-300
		286
prr40-cob	TTCGTGGTCTATATTATGCGAGTTATAGCA	
Col-cob	TTCGTGGTCTATATTATGCGAGTTATAGCA	
cob-genomi	TTCGTGGTCTATATTATGCGAGTTATAGCA	311-340
		325
prr40-cob	GTTTTTTTAGTCTTCATTATTTACTCCCCT	
Col-cob	GTTTTTTTAGTCTTCATTATTTACTCCCCT	
cob-genomi	GTTTTTTTAGTCTTCATTATTTACTCCCCT	551-580
		568
prr40-cob	TTCCTACCGATCTATGCCATTCTTCGTAGT	
Col-cob	TTCCTACCGATCTATGCCATTCTTCGTAGT	
cob-genomi	TTCCTACCGATCTATGCCATTCTTCGTAGT	841-870
		853
prr40-cob	TGTAGCCGCAATAGCACTAGTTTTTATATG	
Col-cob	TGTAGCCGCAATAGCACTAGTTTTTATATG	
cob-genomi	TGTAGCCGCAATAGCACTAGTTTTTATATG	891-920
		908
prr40-cob	TTCGACCGATTACCAAGGAATGTTTGGT	
Col-cob	TTCGACCGATTACCAAGGAATGTTTGGT	
cob-genomi	TTCGACCGATTACCAAGGAATGTTTGGT	971-1000
		982
prr40-cob	TGGACAAATTCTCTTTGGTTTCTTCTT	
Col-cob	TGGACAAATTCTCTTTGGTTTCTTCTT	
cob-genomi	TGGACAAATTCTCTTTGGTTTCTTCTT	1071-1100
		1084

5.25. ábra A mitokondriális apocitokrómból a gén összehasonlító szekvencia analízise.

A *prr40-1* mutáns (*prr40-cob*) és vad típusú növény (*Col-cob*) apocitokrómból a cDNS szekvenciájának összehasonlítása a TAIR adatbázisban megtalálható genomi (*cob-genomi*) szekvenciával (<http://www.arabidopsis.org>). A sárga kiemelés a hét C→U csere helyét (Giegé és Brennicke, 1999) jelöli.

5.8. A *prr40-1* mutánsban sérült a III komplexen keresztüli elektronáramlás

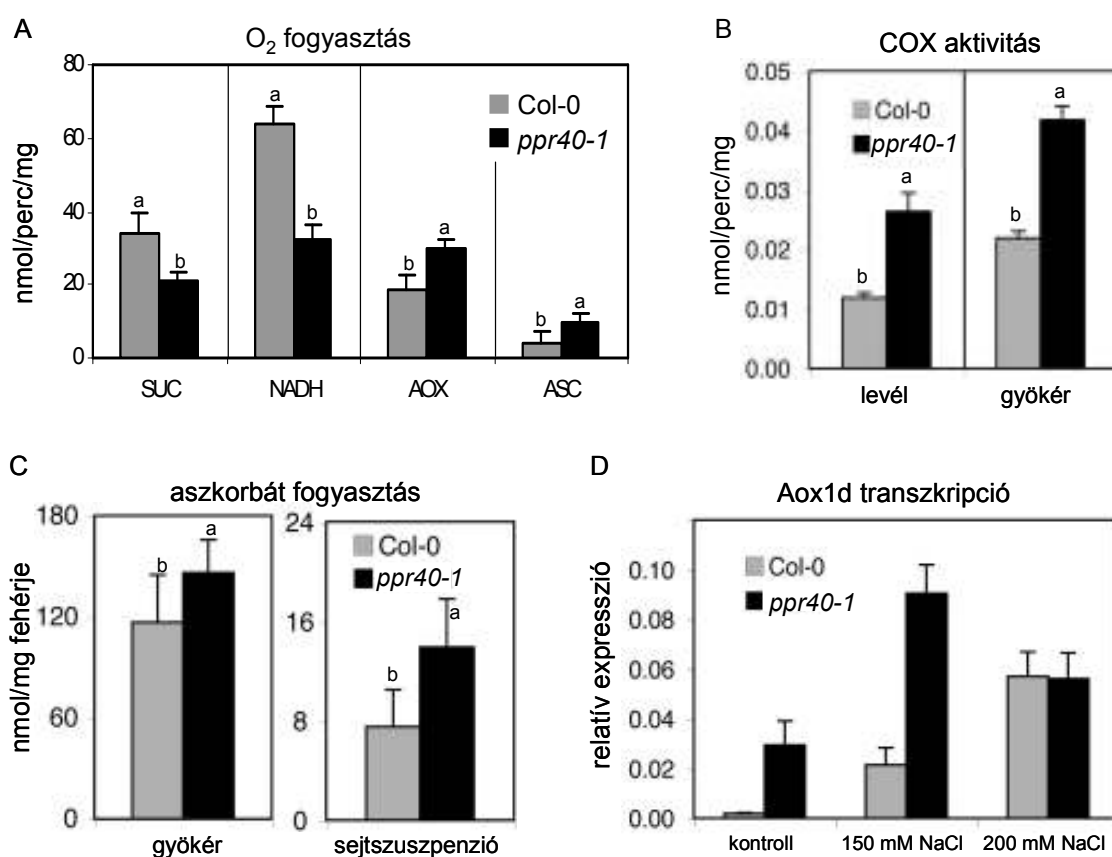
Annak érdekében, hogy a PPR40 szerepét megismerhessük az elektron transzport láncban belül, megvizsgáltuk az ezzel összefüggésbe hozható mitokondriális funkciókban bekövetkező lehetséges változásokat, mint például a különböző légzési szubsztrátok fogyasztását és a reaktív oxigénformák keletkezését. A kísérletekhez gyökérből, levélből és sejtszuspenzióból izolált ép mitokondriumokat használtunk, a mitokondriumok fehérje tartalma alapján azonos mennyiségben. Először NADH-t használtunk elektron donorként, ami az I komplex szubsztrátja. A felvett elektront a I komplex az ubikinon pool-on keresztül a III komplexhez juttatja, majd onnan az elektron a citokrómból a IV komplexre kerül,

ahol az O_2 vízzé redukálódik. Azt tapasztaltuk, hogy a *ppr40-1* mitokondriumok oxigén fogyasztása 50%-kal kisebb, mint a vad mitokondriumoké (5.26. A ábra). Ezután szukcinátot alkalmaztunk légzési szubsztátként ami a II komplex elektron donorja (az elektronszállítási útvonal hasonló: $II \rightarrow \text{ubikinon} \rightarrow III \rightarrow IV \rightarrow O_2$). A méréseknél azt tapasztaltuk, hogy azonos mennyiségű szukcinát hozzáadásakor a vad mitokondriumnál 38%-kal nagyobb O_2 fogyasztást mértünk mint a *ppr40-1* esetében (5.26. A ábra). Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy akár az I akár a II komplexen keresztül juttatjuk be a rendszerbe az elektront, az O_2 fogyás le fog csökkenni.

Ezután megvizsgáltuk a IV komplex működését. Aszkorbinsavat (ASC) használtunk szubsztrátként, ami a IV komplex elektron donorja, és az ASC-ről az elektron közvetlenül az O_2 -hez kerül. Azonos mennyiségű aszkorbát hozzáadásakor az O_2 fogyasztás 2.5-3-szor több volt a *ppr40-1* esetében, mint a vad mitokondriumoknál. Mivel az O_2 fogyasztásban jelentős különbséget tapasztaltunk aszkorbát szubsztrát mellett, megvizsgáltuk azt is, hogy az aszkorbát fogyasztásban van-e különbség. Gyökérből tisztított *ppr40-1* mitokondriumok aszkorbát fogyasztása 25%-kal volt nagyobb, sejtszuspenziót használva pedig 50%-kal volt nagyobb, mint a vad mitokondriumoké (5.26. C ábra). A IV komplexre jellemző enzimaktivitást, a citokróm-c oxidáz (COX) aktivitását is megmértük *ppr40-1* és vad mitokondriumokban. Azt kaptuk, hogy mind levélből mind gyökérből izolált mitokondriumok esetében a *ppr40-1* COX aktivitása kétszerese volt a vad típusúnak (5.26. B ábra). Ezen eredményeinket összegezve már nem csak arra következtethettünk, hogy a IV komplex működőképes, hanem arra is, hogy a *ppr40-1* mutánsokban nagyobb hatékonysággal működik, mint a vad mitokondriumokban. Összegezve tehát elmondhatjuk, hogy a *ppr40-1* mutánsban sérült a elektronszállítási lánc (feltételezhetőleg a III komplexnél), de ennek ellenére a IV komplex elektron felvevő és továbbító képessége ép maradt, és fokozott működésével próbálja kompenzálni a sérülést.

Ha a III komplex lecsökkent citokróm c reduktáz aktivitással rendelkezik, ez az elektronszállítás gátlásához és az ubikinon-poolban az elektronok felhalmozódásához vezet, ami reaktív oxigénformák képződését eredményezheti. Az alternatív oxidázok (AOX) a többlet elektronokat az ubikinon-poolból fel tudják venni, vízzé alakítják az O_2 -t és megakadályozzák a ROS felhalmozódását stressz hatására (Navroth és mtsai., 2007). Annak érdekében, hogy megtudjuk, az AOX aktivitás megváltozott-e a *ppr40-1* mutánsban, először összehasonlítottuk a *ppr40-1* és vad növények stresszválasz-specifikus *Aox1d* transzkript szintjét valós-idejű RT-PCR segítségével. Az *Aox1d* transzkript szintje 15-20-szor nagyobb volt a kezeletlen (kontroll) *ppr40-1*-ben mint a vad típusban, ami arra utalhat, hogy az AOX

aktivitás képes lehet a felhalmozódott elektron-többletet elszállítani. Mérsékelt sóstressz hatására (150 mM NaCl) az *Aox1d* mRNS mennyisége tovább emelkedett mindkét növényben. 200 mM NaCl kezelés után a *ppr40-1* mutánsban már csökkent, míg vad növényekben emelkedett a transzkript szint (5.26. D ábra). Megvizsgáltuk az AOX aktivitását is, és 40%-kal nagyobb aktivitást mértünk a *ppr40-1* esetében mint a vad típusnál. Az eredményeink alátámasztották azt a feltételezésünket, hogy az elektrontranszport a III komplexen keresztül gátolt.



5.26. ábra A *ppr40-1* mutánsban sérült a III komplexen keresztüli elektronáramlás

A: *ppr40-1* és vad sejtszuszpenzióból tisztított mitokondriumokon mért O_2 fogyasztás

B: Citokróm-c oxidáz (COX) aktivitás mérése levélből és gyökérből tisztított *ppr40-1* és vad mitokondriumokon

C: Aszkorbát fogyasztás mérése gyökérből és sejtszuszpenzióból tisztított *ppr40-1* és vad mitokondriumokon

D: A stresszválaszokban érintett alternatív oxidáz 1d (*AOX1d*) gén kifejeződése vad és *ppr40-1* növényben 6 óra 0 mM (kontroll), 150 mM és 200 mM NaCl kezelés hatására, GAPDH-2 génhez viszonyítva

5.9. A *ppr40-1* mutánsban megemelkedett az oxidatív károsodás mértéke

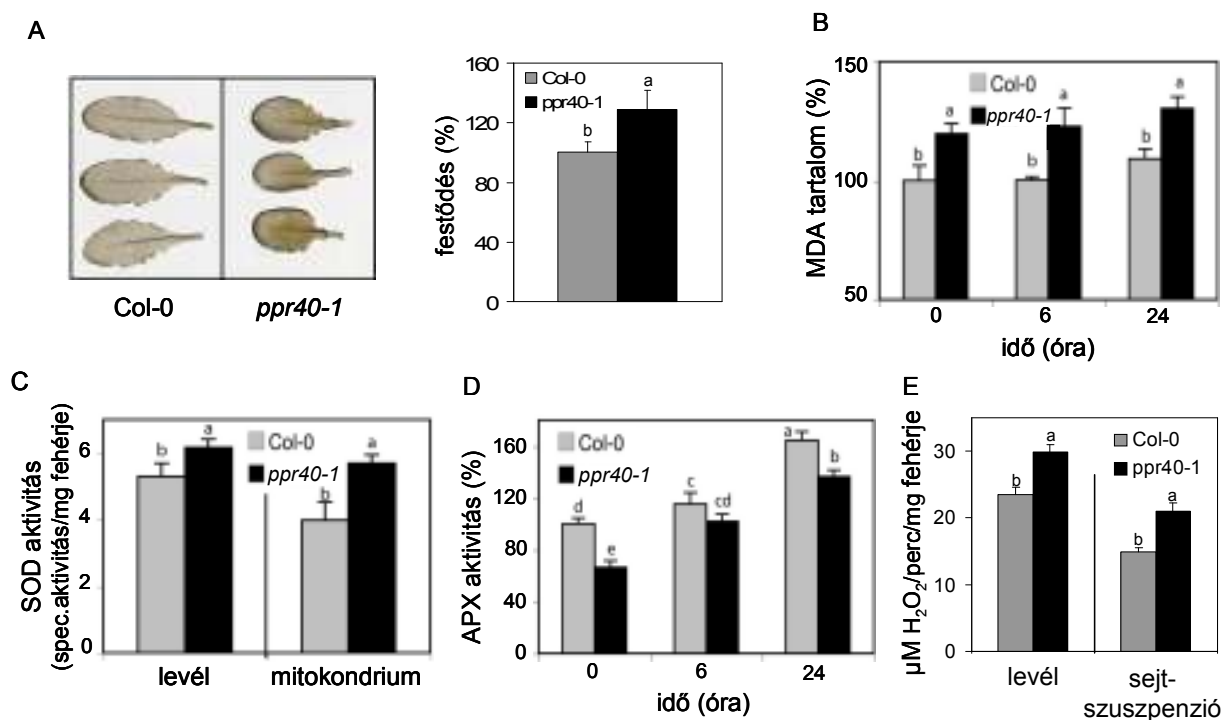
A mitokondriumokban az I és III komplexeket tartják a reaktív oxigénformák (ROS) elsődleges keletkezési helyének az oxidatív légzés alatt (Chen és mtsai., 2003, Navrot és mtsai., 2007). Ebből kiindulva megvizsgáltuk a *ppr40-1* mutánsban a ROS esetleges felhalmozódást és az annak következtében megváltozott folyamatokat.

A H_2O_2 festési eljárásokkal könnyen kimutatható, aránylag stabil ROS. A *ppr40-1* és vad növényekben a H_2O_2 mennyiségének összehasonlítására levágott leveleken DAB festést végeztünk. A *ppr40-1* levelekben 28%-kal nagyobb mértékű H_2O_2 felhalmozódást figyeltünk meg mint a vad levelekben (5.27. A ábra). A ROS okozta károsodás egyik közvetlen következménye a zsírsavak oxidációja, ezért a lipidek károsodásának mértéke fontos jelzésnek számít a ROS felhalmozódásakor. Meghatározása a malondialdehid (MDA) mérésén alapul, amely a lipid peroxidáció során keletkezik. Az MDA mérésekor azt tapasztaltuk, hogy az aránya kontroll körülmények között 20-22%-kal nagyobb volt a *ppr40-1* mutánsban mint a vad növényben (5.27. B ábra), ami alátámasztja a DAB festés eredményeit. Bár 24 óra 200 mM NaCl kezelés kissé növelte a MDA mértékét, a különbség a két növény között hozzávetőleg ugyanannyi maradt mint a kezeletlen kontrollnál.

Stressz vagy specifikus gátlószerek hatására a III komplex működése sérül és szuperoxid gyökök ($O_2^{\cdot -}$) képződnek róla, amik az oxigén leginkább reakcióképes formája. A mitokondriumban az itt található mangán tartalmú szuperoxid-dizmutáz (MnSOD) végzi a $O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2$ átalakítást. Megvizsgáltuk a *ppr40-1* mutáns SOD aktivitását levelekből tisztított enzimm kivonatot használva, és 15%-kal nagyobb értéket kaptunk, mint a vad esetében. Amikor izolált mitokondriumból tisztított enzimm kivonatot használtunk, és ezáltal csak a mitokondriális MnSOD aktivitását mértük, 40%-kal nagyobb aktivitást tapasztaltunk a *ppr40-1* mutánsnál, mint a vad esetében (5.27. C ábra). Az általunk tapasztalt megnövekedett mitokondriális MnSOD aktivitás azt mutatta, hogy a *ppr40-1* mutánsban fokozott a szuperoxid gyök képződés és az azt követő H_2O_2 felhalmozódás, amit a DAB festés eredményei is alátámasztanak.

Szerettünk volna biztosak lenni abban, hogy a *ppr40-1* esetekben H_2O_2 képződés elsődleges forrása a mitokondrium, ezért megmértük a H_2O_2 képződést izolált mitokondriumokban. Gyökérből izolált mitokondriumoknál 20%, míg sejtszuspenzióból izolált mitokondriumoknál 30%-kal több H_2O_2 képződött a *ppr40-1*-ben, mint a vad típusban (5.27. E ábra). A sejtekben keletkezett H_2O_2 -ot az aszkorbát peroxidázok (APX) vízzé tudják

átalakítani egy hatékony folyamatban aszkorbát redukálása közben (Nakano és Asada, 1981). Megmértük a *ppr40-1* és vad növények leveleiből izolált teljes enzimgyúkonatok APX aktivitását. A mutánsban 15-20%-kal alacsonyabb az enzimek aktivitása a vadhoz képest (5.27. D ábra), amiből arra következtettünk, hogy a *ppr40-1* mutáns peroxid detoxifikációs kapacitása is sérült. Sóstressz hatására (6 és 24 óra kezelés, 200 mM NaCl) bár megnőtt az APX aktivitás a növényekben, a különbség jelentősen nem változott.



5.27. ábra Reaktív oxigénformák felhalmozódása a *ppr40-1* mutánsban

A: H_2O_2 kimutatása DAB festéssel vad és *ppr40-1* növények leveleiből ($n=50$, $p<0.001$)

B: MDA tartalom mérése 0, 6 és 24 óra 200 mM NaCl kezelés után. Az arányok megállapításakor a vad kezeletlen növények MDA tartalmát vettük 100%-nak ($p<0.05$).

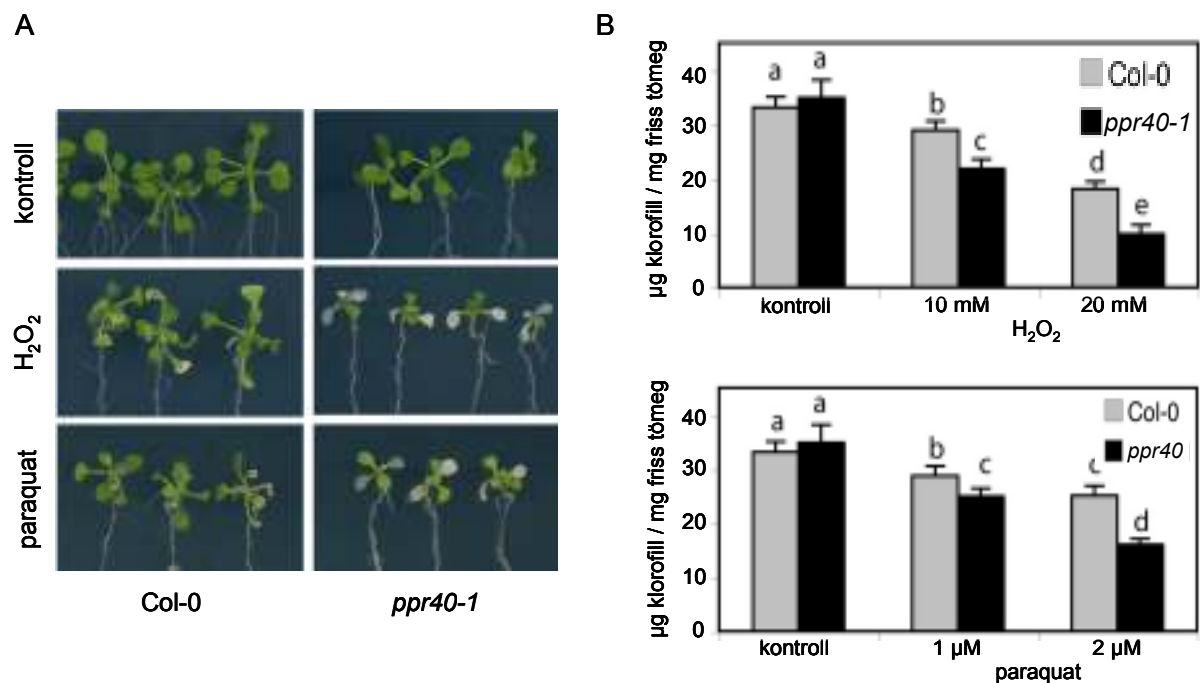
C: SOD aktivitás meghatározása levélből és mitokondriumból tisztított teljes enzimgyúkonatból ($p<0.05$).

D: APX aktivitás változása 6 és 24 óra 200 mM NaCl kezelés hatására, a kontroll (0 óra) a kezeletlen *ppr40-1* és vad növények ($p<0.05$)

E: H_2O_2 képződés mérése levélből és sejtszuszenzióból izolált mitokondriumokban ($p<0.05$)

Arra is kerestük a választ, hogy a *ppr40-1* mutánsban elégtelenül működő ROS detoxifikálás következtében érzékenyebbé válik-e a növény a külső oxidatív stresszre. Vad és *ppr40-1* csíranövényeket különböző koncentrációjú paraquat (szuperoxid gyököket generáló herbicid) és H_2O_2 tartalmú táptalajra raktunk. A *ppr40-1* növények sokkal gyorsabban

kezdték el kifehéredni, a klorofill lebomlás erősebb volt, mint a vad típusúaknak (5.28. A és B ábra).



5.28. ábra A *ppr40-1* érzékeny a H₂O₂ és paraquat kezelésre

A: Két hetes vad és *ppr40-1* növények 4 nap 10 mM H₂O₂ és 2 µM paraquat kezelés hatására eltérő mértékben fehéredtek ki a kontroll (kezeletlen) növényekhez képest

B: Klorofill-a és -b tartalom mérése 4 nap 10 és 20 mM H₂O₂ illetve 1 és 2 µM paraquat kezelt két hetes vad és *ppr40-1* csíranövényeknek ($p < 0.05$).

6. Eredmények megvitatása

6.1. A *ppr40-1* mutáció okozta változások a III komplexen keresztül befolyásolják a mitokondriális elektrontranszportot

A PPR doménnel rendelkező fehérjékről ismert, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatásokban moduláló szerepet játszanak és ezáltal több, eltérő útvonalon keresztül szabályozzák az ubiquitin konjugációt és a sejtek növekedését (Liu és mtsai, 2005). Mind a kloroplasztiszban mind a mitokondriumban megtalálhatóak, és RNS-fehérje kölcsönhatás, illetve fehérje komplexekhez való kapcsolódásuk révén részt vesznek az RNS érési folyamataiban és az organellek szerkezeti stabilitásának biztosításában (Williams és Barkan, 2003; Andrés és mtsai., 2007). Kísérleteink eredményeként megállapítottuk, hogy a PPR40 PPR domént tartalmazó fehérje a mitokondrium III komplexéhez kapcsolódik, ami arra utal, hogy a PPR40 szerepet játszik a III komplex elektrontranszport láncának stabilizálásában. A PPR40 fehérje 14 PPR ismétlődést tartalmaz, ami két különálló domént alkot (5 és 9 PPR). Munkánk során két *ppr40* mutáns allélt jellemeztünk, amelyek különbözően befolyásolták a rozetta levelek fejlődését és az ABS érzékenységet. Ez a különbség összefüggésben van a beépülő T-DNS helyével a *PPR40* génben. A *ppr40-1* allélban a T-DNS a PPR domének előtti részbe épült be és egy 3' végen csonkított transzkript szintézisét teszi lehetővé, amiről egy PPR domének nélküli mitokondriális fehérje képződhet. A *ppr40-2* mutánsban, ahol a fejlődési és stresszválaszok nem mutatnak olyan nagy mértékű elváltozásokat mint a *ppr40-1*-ben, a T-DNS beépülés lehetővé teszi egy hosszabb, de szintén csonkított transzkript szintézisét. Erről a transzkriptről átíródhat egy olyan feltételezett fehérje (PPR40-2), aminek hiányzik a C-terminális része, de az első 5 PPR ismétlődést tartalmazza. A *ppr40-2* mutáns "leaky" fenotípusából arra következtettünk, hogy a feltételezett PPR40-2 fehérje valószínűleg átíródik és részlegesen működik, miközben a *ppr40-1* egy teljes funkcióvesztéses mutáns.

A *ppr40-1* mutánst T-DNS inszerciós mutagenézis programunk során (Szabados és mtsai., 2002) azonosítottuk egy csírázási kísérletsorozatból, ahol fokozott ABS érzékenységet mutatott. További vizsgálatok során kiderült, hogy a vad típushoz képest lassabban csírázik, kisebb méretű, érzékeny a sóstresszre és toleráns a metilglioxál hatására. A *ppr40-1* pleiotróp fenotípusa tehát azt mutatta, hogy a PPR40 működésképtelensége, ami megváltozott

mitokondriális elektrontranszporthoz vezet, széles körben befolyásolta a sejtfunkciókat és a stresszválaszt. A mitokondrium elektronszállítási láncát érintő más növényi mutációkról leírták, hogy okozhat hasonló növekedési problémákat (Guttierres és mtsai., 1997, Lee és mtsai., 2002), valamint hideg érzékenységet (Lee és mtsai., 2002) és citoplazmás hímsterilitást (Newton és Coe, 1986). A mitokondrium légzési folyamataiban bekövetkező változások befolyásolhatják a sejtek anyagcseréjét, a növények növekedését és fejlődését, stresszválaszokat és az adaptációt (Mackenzie és McIntosh, 1999). Mindazonáltal eddig nem jellemeztek olyan növényi mutációt, amelyik III komplex működésére hatna.

A *ppr40-1* mutánsban lecsökkent légzési funkciókból arra következtettünk, hogy a PPR40 fehérje stabilizáló szerepe szükséges a III komplex megfelelő működéséhez. A III komplex (ubikinon-citokrom-c oxidoreduktáz) katalizálja az elektronok áramlását az ubikinonról a citokrom-c-re oxidatív foszforiláció közben. A III komplexen keresztüli elektronáramlást az antimicin A gátolja, ami oda vezet, hogy az ubikinon-pool-ban a felhalmozódó elektronok hatására a redox potenciál értéke az optimális szint fölé emelkedik. Ennek következtében az elektronok átszállítódnak a molekuláris oxigénhez és reaktív szuperoxid anionok képződnek (Navroth és mtsai., 2007). A növényekben a mitokondriális lélegzés alternatív enzimeket és elektron szubsztrátokat alkalmaz, amelyek segítségével a növények képesek elkerülni a fő légzési útvonalakat zavarát (Mackenzie és McIntosh, 1999, Krause mtsai., 2004). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a *ppr40-1* mutánsban a III komplexen keresztüli csökkent elektronszállításhoz megnövekedett citokrom-c oxidáz aktivitás társul, ami valószínűleg az alternatív elektrondonorok, mint például az aszkorbát felhasználására utal. A dehidroaszkorbát (DHA) az aszkorbát oxidált formája, ami a transzporterén keresztül bejutva a mitokondrium mátrixába a II komplexről származó elektronokkal képes aszkorbáttá redukálódni (Szarka és mtsai., 2004). Az ASC szintén egy transzporterén keresztül kijut a két membrán közötti térbe és a citokrom-c-nek adja át a felvett elektronokat, majd a citokrom-c-ről a IV komplexre szállítódnak az elektronok. Így egy "elektronfolyamot" biztosít a II és a IV komplex között. Ez az elkerülő útvonal a *ppr40-1* mutánsban mozgásban tarthatja más alternatív utakkal együtt (például alternatív oxidázok) az elektrontranszport láncot. A III komplex megkerülése által ugyan csökken a protonpumpa aktivitással bíró komplexek száma, de az elektrontranszfer lánc mégis üzemel (valószínűleg alacsonyabb hatásfokkal), és az oxidatív lélegzés és az ATP termelés fenntartható. A *ppr40-1* mutáns a vadhoz képest megnövekedett aszkorbát fogyása is ezt a hipotézist erősítheti meg, de további kísérletek szükségesek ahhoz, hogy egyértelműen bizonyítsuk teóriánkat.

6.2. A *ppr40-1* mutánsban megemelkedett a ROS mennyisége

A III komplex a ROS képződés egyik helye a mitokondriumban. Ha a III komplexbe irányuló elektronáramlás lecsökken, ez megakadályozza a ROS termelődését ezekben az organellumokban. A citokróm oxidáz (IV komplex) aktivitás gátlása a ROS képződés megnövekedéséhez vezet, ami elsősorban az I komplexről történik (Chen és mtsai., 2003). Annak eldöntése érdekében, hogy a PPR40 hiánya befolyásolja-e ezeket a folyamatokat, antioxidáns enzimek működését és a ROS képződését vizsgáltuk meg.

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy MnSOD aktivitása 40%-kal nagyobb a *ppr40-1* mitokondriumokban. Ez az eredmény arra utal, hogy az elektronszállításban bekövetkezett sérülés miatt a felhalmozódó elektronok az O_2 -nel reakcióba lépve szuperoxid anionokat képeznek a *ppr40-1* mitokondriumában, és ezeket a rendkívül reaktív gyököket a MnSOD H_2O_2 -á alakítja. Ezzel a következtetésünkkel összhangban van az a megfigyelés is, hogy a mutáns növények leveleiben megnőtt a H_2O_2 mennyisége a vad növényekéhez képest, illetve fokozott H_2O_2 képződést tapasztaltunk izolált mitokondriumokban. A lipid peroxidáció mértéke is nagyobb a *ppr40-1*-ben, ami logikus következménye az eddig bemutatottaknak.

A növényi mitokondriumokban a ROS képződést hatásosan képesek csökkenteni az oxidatív foszforilációt nem végző légzési utak, amelyek magukba foglalják az alternatív oxidázokat. Az AOX az ubikinon-pool-ból szállítják el az elektronokat az oxigénhez, és ATP termelődés nélkül vizet képeznek vele (Millenaar és Lambers, 2003). Amikor antimicin A-val gátolták a III komplex működését, az AOX1 génnek gyors aktiválódását figyelték meg (Vanlerberghe és McIntosh, 1994). Megvizsgáltuk a stresszválasz függő *AOX1d* kifejeződését *ppr40-1* és vad növényekben, és 15-20-szor nagyobb értéket kaptunk a mutánsban a vadhoz képest, illetve az alternatív oxidáz aktivitás mérésekor 40%-os különbséget találtunk. Ez arra utalhat, hogy az alternatív légzési útvonal (más néven cianid rezisztens légzés) fokozott működésével próbálja kiegyenlíteni a III komplex elektronszállítási zavarát. A *ppr40-1* növényekben a H_2O_2 tartalom és lipid peroxidáció mértékének a megemelkedése azonban azt mutatja, hogy az AOX-on keresztüli kompenzáció teljesen nem képes erre. A sejtekben keletkező H_2O_2 többletet semlegesíthetik a katalázok vagy a H_2O_2 -dal más szubsztrátot oxidáló peroxidázok. Az aszkorbát peroxidázok (APX) az egyik legfontosabb antioxidánsok a növényekben, melyek a citoplazmában, periplazmában, kloroplasztiszokban és a mitokondriumokban is megtalálhatóak (Nakano és Asada, 1981). A *ppr40-1* mutánsban az APX aktivitása jelentősen, 35%-kal lecsökkent, ezáltal még sebezhetőbbé téve azt a ROS-kal szemben. Következtetésünket alátámasztotta az a megfigyelés, miszerint a *ppr40-1* mutáns

jelentősen érzékenyebben reagált a ROS képző paraquat és a külsőleg hozzáadott H_2O_2 hatására. Mindkét esetben szignifikánsan nagyobb klorofill degradációt tapasztaltunk a kezelések hatására a *prr40-1* növényekben, míg kezelés nélkül a vad és *prr40-1* klorofill tartalma megegyezett. Az eredményeink megerősítették azt az elképzelésünket, hogy a *prr40-1* antioxidáns rendszerét elárasztják a mitokondriális elektrontranszport sérülése miatt keletkezett ROS, és a detoxifikációs mechanizmus ezért képtelen hatásosan csökkenteni a megemelkedett ROS szintet stresszhatás alatt. A *prr40-1* mutáns fokozott sóérzékenysége valószínűleg egy válasz a megemelkedett ROS szintre stressz közben.

6.3. A *prr40-1* mutáció befolyásolja a stresszválaszok szabályozását

A csökkentet légzési funkcióval rendelkező mitokondrium a konstitutív stressz-szignálként funkcionáló ROS képzéssel egy állandó stressz állapotot hozhat létre, és ezáltal aktiválhatja a sejtek védekező mechanizmusait. A *prr40-1* mutáns esetében is ezt figyelhetjük meg, amikor fokozott érzékenységet mutatott ozmotikus és oxidatív stresszel szemben, míg a metilglioxál hatására toleránsabbnak bizonyult. Kísérleti eredmények bizonyították, hogy a MG képes megszakítani a mitokondriális légzési láncot az I komplex elektronszállításának specifikus gátlásán keresztül leukocitákban és tumor sejtekben (Biswas és mtsai., 1997, Ray és mtsai., 1994, 1997). A MG gátolja a NADH-függő légzést és az elektronszállítást az I, III és IV komplexen keresztül, de nincs hatással a szukcinát szubsztrátot használó folyamatra, ahol a II, III és IV komplexen átszállítódik az elektron. Szintén nem befolyásolja az elektronok útját a II komplexről közvetlenül a IV komplexre (Ray és mtsai., 1994, Rosca és mtsai., 2002). Ebből adódik, hogy a MG kezelt sejtekben lecsökken az ATP mennyisége és energiahány alakul ki. A III komplex működési zavarából arra következtethetünk, hogy ez egy csökkentett NADH-függő elektron transzportot eredményez a *prr40-1* mutánsban, és azt tapasztaltuk, hogy ez az alternatív elektron donorok (például aszkorbát) használatának megemelkedéséhez vezetett a IV komplexen. Ebből eredően az I komplex MG-al történő gátlását a *prr40-1* mutánsban részlegesen kompenzálta az alternatív elektron transzport, amire a megemelkedett aszkorbát fogyasztás utalt.

A metilglioxál a glioxaláz-ciklus során bomlik el, ami növények esetében a glioxaláz I és glioxaláz II enzimet foglalja magába (Esparteo és mtsai., 1995, Maiti és mtsai., 1997). Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a glioxaláz I és glioxaláz II gének egymástól eltérő módon indukálódnak stressz hatására (Saxena és mtsai., 2005). Kísérleteink során azt

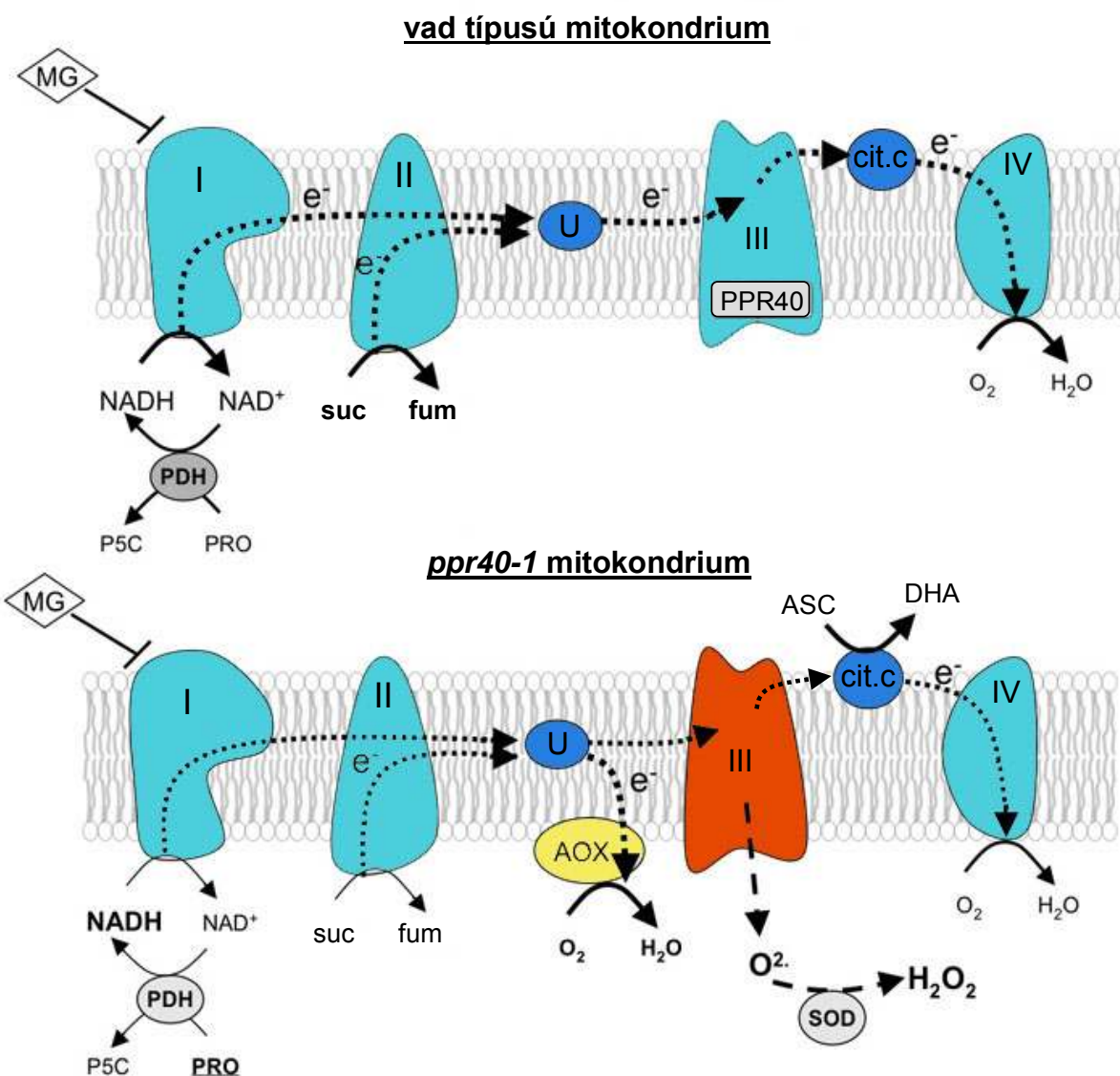
figyeltük meg, hogy néhány jellemzett GLX I és GLX II génnek az alap expressziós szintje magasabb volt a *ppr40-1* mutánsban a vad típushoz képest stresszkezelés hiányában. A *ppr40-1* mutánsban a MG tolerancia válasz így két eseményt foglalhat magába: az elektrontranszport érzéketlenségét a MG gátlásával szemben és a MG lebontási mechanizmusának aktiválását a főbb glioxaláz gének transzkripció szabályozása által.

A stresszhatásokkal szembeni védekezési reakciók aktiválását a különféle stressz-szabályozott metabolikus és élettani válaszok jellemző változásai is jelezhetik. A magas sótartalomra és aszályra adott tipikus metabolikus válasz a prolin felhalmozás, ami megvédi a sejteket az ozmotikus és oxidatív stresszel szemben (Hare és mtsai., 1999, Székely és mtsai., 2008). A stressz hatására bekövetkező prolin felhalmozódása függ a P5CS által szabályozott bioszintézis és a PDH által szabályozott mitokondriális lebontási útvonalaktól, amelyek ozmotikus stressz-szignál hatására indukálódnak és represszálódnak (Yoshida és mtsai., 1995, Peng és mtsai., 1996, Kiyosue és mtsai., 1996). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a *PDH1* transzkript szintje szignifikánsan alacsonyabb volt sókezelés hatására, míg a prolin képződés megemelkedett a *ppr40-1* mutánsban a vadhoz képest a sókezelt és a kezeletlen mintákban egyaránt. A PDH1 útján történő prolin lebontás a mitokondriumban folyik és redukált NADH/NADPH-t generál, amit az oxidatív foszforilációs rendszer elektron donorként használ fel (Hare és mtsai., 1998). A III komplex működési zavara oda vezet, hogy lecsökken a NADH-függő elektron transzport és feltehetően lecsökken a $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ szint, ami előre jelez egy lehetséges csökkenést a prolin oxidációjában a *ppr40-1* mutáció miatt. A *ppr40-1* mutánsban a megemelkedett prolin szint ebből adódóan egy közvetlen következménye lehet a mitokondriális elektronszállítás és prolin lebontás meghibásodásának, ez utóbbit a *PDH1* gén transzkripció szintjének csökkenése is jelzi.

A prolin oxidációjának szabályozási mechanizmusa valószínűleg részt vesz egy általános ozmotikus stresszre adott válaszreakciók szabályozásában, mely magában foglalja a hasonló metabolikus változásokat, mint például a prolin felhalmozódást és a vízvesztés szabályozását a sztómazáródás által. Ebből a szempontból jelentős, hogy a *ppr40-1* mutáns ABS indukált sztómazáródása gyorsabb, ami összhangban van az ABS-val szembeni nagyobb érzékenységgel. Mindazonáltal azok az erőfeszítéseink, hogy a PPR40 funkcióját a fontosabb transzkripció faktorok expressziójában bekövetkező korrelatív változásokkal társítsuk a párhuzamos ABS-függő stresszválasz útvonalakban, nem nyújtottak egyértelmű eredményt. Ez az előzőekben tárgyalt bizonyítékokkal együtt alátámasztja azt a következtetésünket, hogy a *ppr40-1* mutáns ABS és só túlérzékenységet egy, a mitokondriumban bekövetkezett rendellenesség okozza a ROS képződése és ATP termelés

korlátozása által. ROS közvetített jelátvitel nemcsak a programozott sejthalál irányításával kapcsolható össze (Laloi és mtsai., 2004, Gechev, 2006), de hatása bizonyított a kalcium és ABS jelátvitelen keresztül a sztómazáródás szabályozására is (Price mtsai., 1994, Leung és Giraudat, 1998). ROS szintén részt vesznek ionos stresszválaszokban a kalcium jelátvitel irányításában (Liu és Zhu, 1998, Chinnusamy és mtsai., 2004.), és aktivál egy MAP kináz kaszkádot, ami részt vesz a "cross-talk"-ban biotikus és abiotikus stressz-szignál utak között (Kovtun és mtsai., 2000).

A *ppr40-1* további vizsgálata lehetőséget ad arra, hogy pontosabb válaszokat kapjunk a mitokondriális elektrontranszport szerepére a reaktív oxigén formák keletkezésében, és ezáltal nagyszámú stresszindukált jelátviteli folyamatra gyakorolt hatására.



6.1. ábra A mitokondriális elektronszállítás feltételezett modellje a vad és *p_{pr40-1}* növényekben

MG: metilglioxál; PRO: prolin; suc: szukcinát; fum: fumarát; U: ubikinon; ASC: aszkorbinsav; DHA: dehidro-aszkorbinsav; cit.c: citokróm c ; AOX: alternatív oxidázok; SOD: szuperoxid-dizmutáz

A vad típusú mitokondriumokon belül az elektron szállítható az I→III→IV komplexen keresztüli útvonalon, vagy a II→III→IV komplexeken át az O₂-hez. A MG képes megakadályozni az elektronok elszállítását az I komplexről a NADH-függő elektrontranszport hatékony gátlása által. A prolin oxidációja a mitokondriumban zajlik NADH redukciója mellett. A *p_{pr40-1}* mutánsban akadályozott az elektronszállítás a redukáltan működő III komplex miatt, és ez kényszeríti a IV komplex esetében az alternatív szubsztát (mint például az aszkorbát) használatára a mitokondriumot. A részlegesen gátolt III komplexen elektron felesleg és ebből következően szuperoxid anion keletkezik, ami a ROS okozta sérülésekhez vezet. Az AOX segíti az elektron felesleg elszállítását és a szuperoxid anionok felhalmozódásának csökkentését. Mivel az elektronszállítás I→III komplexen keresztüli útvonala sérült, a MG toxikus hatása lecsökken. A prolin oxidáció lecsökken a NADH feleslege és a NAD⁺-pool csökkenése miatt, ami a prolin szint megemelkedéséhez vezet.

7. Összefoglalás

Az eukarióta sejtekben a mitokondriális elektron transzport rendszer szolgáltatja a fő energiaellátást az oxidatív légzéskor termelődött ATP-n keresztül. A dolgozatomban bemutatom, hogy egy, a mitokondriumban lokalizálódó pentatrikopeptid repeat (PPR) doméneket tartalmazó fehérje, a PPR40 összekapcsolja a mitokondriális elektron transzportot a stresszválaszokkal és a hormonális szabályozással. A kis növesű *ppr40-1* mutáns fokozott só, ABS, cukor és ozmotikus stressz érzékenységet mutat, miközben a metilglioxál toxikus hatásával szemben ellenállóbbnak bizonyult, mint a vad típusú *Arabidopsis thaliana*. A teljes hosszúságú PPR40 cDNS túltermeltetése a *ppr40-1* mutáns növényekben helyreállította a megváltozott só és ABS érzékenységet és a csökkent méretet. A PPR40 fehérje a mitokondriumba lokalizálódik, és a mitokondriális légzési lánc III komplexéhez kapcsolódik. A *ppr40-1* mutánsban a III komplexen keresztüli elektronáramlás erősen lecsökkent, miközben a IV komplex működik, ami arra utal, hogy a PPR40 fehérje jelentős szerepet játszik a III komplex citokróm c redukáz aktivitásának fenntartásában. A *ppr40-1* mutáns fokozott stresszérzékenységehez magasabb SOD aktivitás, reaktív oxigénformák felhalmozódása, felerősödött lipid peroxidáció és prolin felhalmozódás társul. Ezeken kívül néhány, a stresszválaszban szerepet játszó gén - az alternatív oxidáz *AOX1d* és az 1 és 2 glioxalázok fehérjéit kódoló gének - aktivitása megváltozik. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy szoros kapcsolat van az oxidatív légzés és a környezeti alkalmazkodás között *Arabidopsisban*.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a PPR40 fehérje hiánya következtében sérülnek a mitokondrium elektrontranszport folyamata, fokozódik a ROS képződés, és alternatív elektronszállítási útvonalak aktiválódnak. Tehát a PPR40 elengedhetetlenül szükséges a mitokondriális légzési lánc zavartalan működéséhez.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Szabados Lászlónak szakmai irányításáért és tanácsaiért, és a munkám során nyújtott segítségéért. Köszönöm, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy csoportjában dolgozva elsajátíthassam a molekuláris növénybiológia alapjait.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Koncz Csabának értékes szakmai segítségéért, és Dr. Koncz Zsuzsának nélkülözhetetlen tanácsaiért.

Szeretném megköszönni Dr. Szarka Andrásnak, Dr. Darula Zsuzsannának, Dr. Ötvös Krisztinának, Dr. Tari Irmának, Dr. Horváth V. Gábornak, Dr. Doró Péternek és Mocsonoky Miklósnak a munkám során nyújtott értékes elméleti és gyakorlati segítségét.

Ezúton szeretném megköszönni az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport minden tagjának a támogatását. Külön köszönöm Király Annamária és Gál Mónika kiváló asszisztensi munkáját, Dr. Cséplő Ágnes, Rigó Gábor és Székely Gyöngyi hozzájárulását e dolgozat megszületéséhez.

Végezetül köszönöm családomnak és férjemnek, hogy mindvégig támogattak.

9. Irodalmi hivatkozások

An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB (1996) Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* **10**: 107-121

Andrés C, Lurin C, Small ID (2007) The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol Plant* **129**: 14–22

Apel K and Hirt H (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399

Arora A, Sairam RK and Srivastava CG (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science* **82**: 1227-1238

Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore JG, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York. John Wiley & Sons.

Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* **13**: 3170-3181

Baulcombe DC, Saunders GR, Bevan MW, Mayo MA, Harrison BD (1986) Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**: 446-449

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* **316**: 1194-1199

Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang L-s, Crofts AR (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem* **69**: 1005–1075

Biswas S, Ray M, Misra S, Dutta DP, Ray S (1997) Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem J* **323**: 343-348

Blatch GL, Lässle M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**: 932-939

Brandt P, Unseld M, Eckert-Ossenkopp U, Brennicke A (1993) An *rsp14* pseudogene is transcribed and edited in *Arabidopsis* mitochondria. *Current Gen.* 24: 330-336

Cadenas E (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* **58**: 79-110.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**: 36027-36031

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156

Clifton R, Millar AH, Whelan J (2006) Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 730-41

Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR, Udvardi MK (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J* **38**: 366-79

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 5-17

Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**: 159–172

- Desloire S, Gherbi H, Laloui W, Marhadour S, Clouet V, Cattolico L, Falentin C, Giancola S, Renard M, Budar F, Small I, Caboche M, Delourme R, Bendahmane A** (2003) Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep* **4**: 588-594
- Dhindsa RA, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA** (1981) Leaf senescence: correlated with increased permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* **126**: 93–101
- Dlasková A, Špaček T, Škobisová E, Šantorová J, Ježek P** (2006) Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 467–473
- Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP** (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *PNAS* **102**: 3225–3229
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP** (2006) Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* **11**: 232-240
- Ferrando A, Farràs R, Jasik J, Schell J and Koncz C** (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J* **22**: 1–8
- Finkelstein RR, Rock CD** (2002) Absciscic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis Book*, eds.: American Society of Plant Biologists, pp 1-48
- Foyer CH** (1993): Ascorbic acid. In: *Antioxidants in Higher Plants*. R.G. Alscher and J.L. Hess (eds) CRC Press, Boca Raton, 31-58
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C** (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* **28**: 1091–101

Giegé P and Brennicke A (1999) RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15324-15329

Gutierrez S, Sabar M, Lelandais C, Chetrit P, Diolez P, Degand H, Boutry M, Vedel F, de Kouchkovsky Y, De Paepe R (1997) Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3436-3441

Gutierrez-Marcos JF, Dal Pra M, Giulini A, Costa LM, Gavazzi G, Cordelier S, Sellam O, Tatout C, Paul W, Perez P, Dickinson HG, Consonni G (2007) Empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. *Plant Cell* **19**: 196-210

Hare PD, Cress WA, van Staden J (1999) Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. *J Exp Bot* **50**: 413-434

Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout A, Day DA, Whelan J, Millar AH (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signalling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs and points to plant specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* **16**: 241-256

Ho LHM, Giraud E, Lister R, Thirkettle-Watts D, Low J, Clifton R, Howell KA, Carrie C, Donald T, Whelan J (2007) Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol* **143**: 1519-1533.

Hossain A and Asada K (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* **25**: 85-92.

Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**: 1323-35

Koncz C, Martini N, Szabados L, Hrouda M, Bachmair A, Schell J (1994)

Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In S Gelvin, B Schilperoort, eds., Plant Molecular Biology Manual, B2, Kluwer Academic, Dordrecht, pp 1-22

Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proc Natl Acad Sci USA **97**: 2940-2945

Krause F, Reifschneider NH, Vocke D, Seelert H, Rexroth S, and Dencher NA (2004) "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. J Biol Chem **279**: 48369–48375

Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. Curr Opin Plant Biol **7**: 323–328

Lee Bh, Lee H, Xiong L, Zhu JK (2002) A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. Plant Cell **14**: 1235-51

Leung J, Giraudat J (1998) Absciscic acid signal transduction. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 199-222

Leymarie J, Vavasseur A, Lascève G (1998) CO₂ sensing in stomata of *abi1-1* and *abi2-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochem **36**: 539 543

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol **148**: 350-382

Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. Science **280**: 1943–1945

Liu S, Zhang C, Zhou Y (2005) Domain graph of Arabidopsis proteome by comparative analysis. J Proteome Res. **4**: 435-444.

Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette M, Mireau H, Peeters N, Renou J, Szurek B, Taconnat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**: 2089–2103

Maiti MK, Krishnasamy S, Owen HA and Makaroff CA (1997) Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **35**: 471–481

Mackenzie S, McIntosh L (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell* **11**: 571-586

Maxwell DP, WangY, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8271–8276

McClung CR (1997): Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free radical Biology & Medicine*, **23**: 489-496

Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G (2003) HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell* **15**: 1480-1495

Millenaar FF, Lambers H (2003) The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biol* **5**: 2–15

Møller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867–880

Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* **129**: 185-195

Newton KJ, Coe EH (1986) Mitochondrial DNA changes in abnormal growth (nonchromosomal stripe) mutants of maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 7363-7366

Oguchi T, Sage-Ono K, Kamada H, Ono M (2004) Genomic structure of a novel *Arabidopsis* clock-controlled gene, AtC401, which encodes a pentatricopeptide repeat protein. *Gene* **330**: 29-37

Pandey S and Assmann SM (2004) The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* **16**: 1616-1632

Peng Z, Lu Q, Verma DP (1996) Reciprocal regulation of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet* **253**: 334-341

Perales M, Eubel H, Heinemeyer J, Colaneri A, Zabaleta E, Braun HP (2005) Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I+III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *J Mol Biol* **350**: 263–277

Plaxton WC, Podesta FE (2006) The functional organisation and control of plant respiration. *Crit Rev Plant Sci* **25**: 159–198

Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffiths A, Trewavas AJ, Knight MR (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**: 1301–1310

Raghavendra AS, Padmasree K (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci* **8**: 1360-1385

Ray S, Biswas S and Ray M (1997) Similar nature of inhibition of mitochondrial respiration of heart tissue and malignant cells by methylglyoxal. A vital clue to understand the biochemical basis of malignancy. *Mol Cel Biochem* **171**: 95-103

Ren D, Yang H, Zhang S (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**: 559-565

Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* **57**: 1017-23
Epub

Rosca MG, Monnier VM, Szweda LI, Weiss MF (2002) Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F52-59

Saxena M, Bisht R, Roy SD, Sopory SK, Bhalla-Sarin N (2005) Cloning and characterization of a mitochondrial glyoxalase II from *Brassica juncea* that is upregulated by NaCl, Zn, and ABA. *Biochem Biophys Res Commun* **336**: 813-819

Siedow JA, Day DA (2000) Respiration and photorespiration. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD pp 676-728

Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK (2003) Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 14672-14677

Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**: 46-47

Stewart CR, Voetberg G (1985) Relationship between Stress-Induced ABA and Proline Accumulations and ABA-Induced Proline Accumulation in Excised Barley Leaves. *Plant Physiol.* **79**: 24-27

Sunkar R, Bartels D, Kirch HH (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J* **35**: 452-464

Sweetlove LJ, Fait A, Nunes-Nesi A, Williams T, Fernie AR (2007) The mitochondrion: an

integration point of cellular metabolism and signalling. *Crit Rev Plant Sci* **26**: 17-43

Szabados L, Kovács I, Oberschall A, Abrahám E, Kerekes I, Zsigmond L, Nagy R, Alvarado M, Krasovskaja I, Gál M, Berente A, Rédei GP, Haim AB, Koncz C (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J* **32**: 233-242

Szarka A, Stadler K, Jenei V, Margittai É, Csala M, Jakus J, Mandl J, Bánhegyi G (2002) Ascorbyl Free Radical and Dehydroascorbate Formation in Rat Liver Endoplasmic Reticulum. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **34**: 317-323

Szarka A, Horemans N, Bánhegyi G, Asard H (2004) Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **428**: 73-80

Szarka A, Horemans N, Kovács Z, Gróf P, Mayer M, Bánhegyi G (2007) Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiol Plant* **129**: 225-232

Székely Gy, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz Cs, Szabados L (2008) Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* perform distinct regulatory functions in proline biosynthesis. *Plant J* **53**: 11-28

Thirkettle-Watts D, McCabe TC, Clifton R, Moore C, Finnegan PM, Day DA, Whelan J (2003) Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean. *Plant Physiol* **133**: 1158–1169

Tretter L, Adam-Vizi V (2000) Inhibition of Krebs Cycle Enzymes by Hydrogen Peroxide: A Key Role of α -Ketoglutarate Dehydrogenase in Limiting NADH Production under Oxidative Stress. *The Journal of Neuroscience* **20**: 8972–8979

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1994) Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiol* **105**: 867-74

Vanlerberghe GC, Ordog SH (2002) Alternative oxidase: integrating carbon metabolism

and electron transport in plant respiration. In GH Foyer, G Noctor, eds, *Advances in Photosynthesis and Respiration, Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*, Vol 12, Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp 173–191

Werhahn W, Niemeyer A, Jansch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (2001) Purification and Characterization of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from *Arabidopsis*. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol* **125**: 943–954

Williams PM, Barkan A (2003) A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J* **36**: 675-686

Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006) Blue-Native PAGE. *Nature Protocols* **1**: 416-428

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* **10**: 88-94

Yokoi S, Bressan RA and Hasegawa PM (2002): Salt Stress Tolerance of Plants. JIRCAS Working Report, 25-33

Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K (1995) Correlation between the induction of a gene for 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J* **7**: 751-760

Yu CA, Yu L, King TE (1975) Studies on Cytochrome Oxidase. Interactions of the Cytochrome Oxidase Protein with Phospholipids and Cytochrome C. *The Journal of Biol Chem* **250**: 1383-1392

Zechmann B, Zellnig G and Muller M (2006): Immunocytochemical localization of glutathione precursors in plant cells. *Journal of Electron Microscopy*, **55**: 173–181

10. Ph. D. thesis

Background

Adaptation of plants to environmental changes has influence on numerous metabolic pathways, including changes in photosynthesis, respiration, metabolite assimilation and catabolism. Mitochondria are in the centre of regulation of cellular energy homeostasis and redox balance and integrate metabolic pathways (e.g. Krebs cycle) that are important in adaptive responses to extreme environmental conditions (Sweetlove et al., 2007). Respiration is the core process of mitochondrial metabolism; during this procedure large amount of free energy is released from the oxidative phosphorylation reactions of electron transport system, and it used for ATP production. The electron transport chain of plant mitochondria is composed of four respiratory complexes. Depending on the substrate, electrons are transported from Complex I (NADH dehydrogenase) and Complex II (succinate dehydrogenase) through ubiquinon and Complex III (cytochrome c reductase) to cytochrome c and to Complex IV (cytochrome c oxidase), which produces water. In the energy conserving pathway ATP is generated by Complex V (ATP synthase), which is connected to the electron transport system tight. When the electron transport in the cytochrome c pathway is blocked (stress conditions, specific inhibitors), alternative oxidases (AOX) help to maintain the electron flux and functional Krebs cycle (Vanlerberghe and Ordog, 2002).

Plant mitochondrial electron transport is also important to neutralize the excess of reducing capacity of photosynthesis, preventing oxidative damage of thylakoid membranes and other cellular components (Raghavendra and Padmasree, 2003). Reactive oxygen species (ROS) are produced in the mitochondrial electron transport chain, where Complex I and Complex III are major sites for ROS synthesis in the darkness and in non-green tissues. Mitochondrial electron transport is implicated in ROS production during different biotic and abiotic stresses (Navrot et al., 2007). ROS can oxidize and damage cellular structures, macromolecules, nucleic acids, proteins and lipids. Besides being damaging agents, ROS are important signalling compounds implicated in the control of plant development, adaptation to environmental stress conditions, defense and programmed cell death. In interaction with other signalling molecules (e.g., lipid signals, nitrogen oxide, calcium ions and plant hormones) ROS control protein stability and gene expression (Gechev et al., 2006).

The pentatricopeptide repeat (PPR) protein family is particularly large in plants. In the *Arabidopsis* genome 441 putative *PPR* gene were identified (Lurin et al., 2004). Although several *PPR* genes have been characterized in the last few years and it is known that PPR proteins are localized either in mitochondria or plastids, the biological function of most PPR genes is still unknown. The PPR protein family is characterized by 9-15 tandem arrays of pentatricopeptide repeats, which are composed of degenerate 35 amino acid units (Small and Peeters, 2000). PPR repeats form helical structures and are considered to be RNA binding motifs. PPR domains are related to tetratricopeptide repeats, which can participate protein-protein interactions suggesting that PPR domains may have similar functions also. PPR proteins are implicated in the regulation of organellar gene expression by controlling diverse aspects of organellar RNA metabolism, such as RNA splicing, editing, processing and translation. The PPR genes can influence diverse biological processes including cytoplasmic male sterility, circadian clock, seed development, and transcription and translation of plastid-encoded mRNAs and proteins. Embryo lethality, reduced fertility and dwarf phenotype was associated with several PPR gene mutations suggesting that they have important functions in the regulation of plant growth and development (Andrés et al., 2007).

Aim of our study

In our laboratory we have identified an ABA hypersensitive T-DNA insertion *Arabidopsis thaliana* mutant (*ppr40-1*) which showed semi-dwarf growth. We would have liked to characterize the function of the *PPR40* gene affected by the mutation with the detailed examination of this mutant. For the characterisation we had to answer for the following questions:

- Does the mutant show sensitivity against some other kind of abiotic stresses?
- Does the T-DNA insertion result in inactivation of *PPR40* gene, and is there connection between stress responses and gene inactivation?
- Could the changed phenotype of the mutant be restored by overexpressing of *PPR40*?
- What kind of intracellular localisation has the PPR40 protein?
- Is there any relationship between the protein localisation and the stress sensitivity of the *ppr40-1* mutant?

Results and Discussion

The *ppr40-1* mutant was identified from our T-DNA-tagged *Arabidopsis* mutant collection (Szabados et al., 2002). The mutant showed semi-dwarf growth and ABA hypersensitivity. Characterization of the *ppr40* mutation identified a tandem inverted T-DNA in the transcribed region of gene *At3g16890*. The T-DNA insertion was localized 311 bp downstream of the predicted ATG codon. In the SALK insertion mutant collection we characterized a second mutant allele (*ppr40-2*), in which the T-DNA insertion occurred at 852 bp downstream of the ATG. The predicted PPR40 protein has 14 PPR domains, arranged in 5 and 9 tandem repeats. The *ppr40-1* and *ppr40-2* mutants represented a strong and a weak allele, respectively, with clear difference in plant growth and ABA sensitivity: *ppr40-1* was 50% smaller, whereas the *ppr40-2* mutant was 20% smaller in seedling and rosetta stage in comparison to wild type; in the presence of 0.5 μ M ABA only 20% of *ppr40-1* seeds germinated after 1 week compared to germination of 60% *ppr40-2* and 98% wild type seeds. Predicted N-terminal translation products in the *ppr40-1* allele terminated before the PPR repeats, while in the *ppr40-2* allele the predicted truncated protein carries five N-terminal PPR domains. The difference in the phenotypes of the two alleles suggest that the truncated protein with five N-terminal PPR domain, which is produced in the *ppr40-2* is partially functional, while the *ppr40-1* allele represents a real knockout mutation. We used the *ppr40-1* for the further analysis. Expression analysis of *At3g16890* showed that the gene is constitutively transcribed at low levels in all tissue types.

In order to characterize the physiological responses of the *ppr40-1* mutant to various environmental conditions and plant hormones, we performed seed germination and seedling growth assays. The *ppr40-1* proved to be sensitive to glucose, sucrose and NaCl during germination and root elongation, but had no difference in germination and growth of *ppr40-1* and wild type in response to changes of other environmental (continuous light and dark) and stress (heat-shock and heavy metals) conditions. Except ABA, the *ppr40-1* mutant and wild type also showed similar responses to treatments with plant hormones.

To confirm the connection between the mutant phenotype and the T-DNA insertion mutation in the *At3g16890* gene, we performed the *PPR40-HA* gene construct and introduced into the *ppr40-1* mutant by *Agrobacterium*-mediated transformation. Several transgenic lines expressing the PPR40-HA construct, and the phenotype of complemented *ppr40-1* plants was similar to wild type in all germination and seedling growth assays. Consequently, we

confirmed that the *ppr40-1* mutant phenotype was indeed caused by the T-DNA insertion mutation.

To further analyze the biological function of this protein, we transformed the *PPR40-HA* gene construct into the wild type plants. Expression of the transgene was tested by northern hybridization and western analysis. Stress responses of the *PPR40-HA* overexpressing plants were tested in germination assays. The PPR-HA protein overexpressing transgenic lines showed insensitivity to toxic concentrations of NaCl, glucose, and ABA treatments at germination level. Improved germination of PPR40 overexpressing plants suggested that PPR40 protein may have important protective role in mitochondria.

On the base of ABA sensitivity we examined the ABA induced stomatal closure and water loss of *ppr40-1* plants in a desiccation assay. We found that stomatal closure is more sensitive to ABA in the *ppr40-1* mutant compared to wild type. Water loss of the mutant leaves was significantly slower compared to wild type correlating with ABA sensitivity of stomatal closure of the *ppr40-1* mutant. To determine whether enhanced ABA sensitivity of *ppr40-1* correlates with either elevated ABA biosynthesis or alteration in signal transduction, we compared the free ABA concentrations in wild type and *ppr40-1* plants. We did not find notable difference between the mutant and wild type plant only as results of extreme stress conditions. This point to the fact that presumably the mutation has no direct connection to ABA biosynthesis. To study the transcript levels of a few stress and ABA induced transcription factors and other regulatory genes we performed a series of quantitative RT-PCR assays. The expression data indicated that the *PPR40* function was not implicated in the primary control of ABA signalling.

Proline accumulation is a characteristic osmotic and salt stress response in plants. We observed that under salt stress the mutant accumulates two to three fold higher proline level compared to wild type plants. Meanwhile, we tested the transcript levels of *P5CS1* (biosynthetic pathway) and *PDH1* (catabolic pathways) genes. Steady state mRNA levels of the *P5CS1* gene were two times higher in the mutant in standard growth conditions, while it was similar in salt-stressed plants. *PDH1* levels were similar in control plants, but were reduced by 50% in the salt-treated *ppr40-1* mutant compared to wild type plants. Repressed PDH transcription could therefore contribute to increased proline accumulation in the *ppr40-1* mutant, but this effect is likely indirect.

Although the *ppr40-1* mutant is more sensitive to salt and osmotic stress, we found that it showed increased tolerance to methylglyoxalate, a toxic byproduct of glycolysis. Methylglyoxalate is catabolized by the glyoxalase system, consisting of two enzymes,

glyoxalase I (*GLX1*) and glyoxalase II (*GLX2*). We examined the expression of several *GLX1* (*GLX1-1*, *GLX1-2*, *GLX1-3*) and *GLX2* (*GLX2-1*, *GLX2-2*), and our results showed that glyoxalase genes have higher transcript levels under standard growth conditions in the *ppr40-1* mutant compared to wild type. Enhanced expression of glyoxalase genes appeared thus to account for the enhanced MG tolerance of the *ppr40-1* mutant.

In order to determine the intracellular localisation of PPR40 protein, we analysed PPR40-HA protein overexpressing plants and cell culture. The presence of PPR40-HA protein in different subcellular fractions was tested by western blotting using a monoclonal anti-hemagglutinine (HA) antibody. The PPR40-HA protein was detected in mitochondria but not in chloroplasts or in other organelles. Immunohistochemical detection using FITC-labelled anti-HA antibody and was verified mitochondrial localization of the PPR40 protein. To search for possible function of PPR40, we investigated the association of PPR40-HA with protein complexes of mitochondrial electron transport system using sucrose gradient centrifugation and two-dimensional blue-native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis (BN/SDS-PAGE) followed by detection of HA-epitope. We isolated mitochondria from PPR40-HA overexpressing cell cultures. Afterwards the sucrose gradient centrifugation the fractions were analysed by BN-PAGE and western blotting using anti-HA antibody. Immunoblotting detected PPR40-HA in a protein complex of about 500 kDa in the sucrose gradient fractions. The size of this complex corresponded to that of Complex III of mitochondrial electron transport system. To confirm association of PPR40-HA with ComplexIII, preparative two-dimensional BN-PAGE and SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed. Using this alternative separation method, PPR40-HA was also detected in Complex III by western blotting of preparative BN gels. Composition of the PPR40-HA protein-associated protein complex was analyzed subsequently by proteomic methods. The PPR40-HA containing protein complex was excised from the BN and subjected to resolution of its subunits by SDS-PAGE. Subsequent western analysis confirmed that the excised complex indeed carried PPR40-HA of predicted molecular mass of 74 kDa in association with five major subunits of Complex III system that were identified by mass spectrometry. The results of proteomics analysis thus confirmed that PPR40 was associated with Complex III in the mitochondrial electron transport system. We tested the lack of PPR40 protein caused any alteration in the composition of electron transport complexes. Mitochondria were isolated from wild type and *ppr40-1* mutant cell suspension cultures and membrane proteins were separated in BN/SDS gels. The respiratory complexes and the subunits of Complex III from wild type and mutant mitochondria showed similar patterns thus the *ppr40-1* mutation does

not affect the composition of Complex III. Furthermore, the *ppr40-1* mutation did not appear to influence the transcript levels of genes coding for subunits of Complex III. Quantitative RT-PCR analysis of mRNA levels of these genes revealed no more than 50% difference between wild type and the *ppr40-1* mutant.

To examine whether PPR40 controls splicing or editing of mitochondrial mRNAs, we analysed the mitochondrial apocytochrome B (*cob*, *ATMG00220*). *cob* is the only Complex III subunit, which is encoded by the mitochondrial genome and is expressed as a 5 kb transcript. All other Complex III subunits are encoded in nuclear genome. We used northern hybridization of total mitochondrial RNA isolated from wild type, *ppr40-1* mutant and complemented mutant plants. We observed no difference in *cob* transcript size between mutant, wild type and complemented plants. To test whether editing of apocytochrome B mRNA is different in *ppr40-1* mutant, full length *cob* cDNA was amplified and sequenced from RNA samples of wild type, mutant and complemented mutant plants. Sequence analysis could identify all seven *cob* C→U editing sites in each ORFs, and confirmed that RNA editing did not change in the *ppr40-1* mutant.

Association of the PPR40 protein with Complex III in the mitochondrial electron transport system prompted us to test possible alterations in respiration and associated mitochondrial functions, such as consumption of different respiration substrates and generation of reactive oxygen species. Respiration was measured by oxygen consumption in intact mitochondria. When NADH (electron donor for Complex I) was used as respiratory substrate, oxygen consumption was 50% lower in the *ppr40-1* mitochondria compared to the wild type. When succinate (electron donor for Complex II) was added oxygen consumption 40% lower in the *ppr40-1* mitochondria. These data indicated that electron transport through Complex I and Complex II was greatly reduced in the mutant. To test the other function of the electron transport system, we used ascorbate as respiratory substrate for Complex IV to measure direct electron transport from this substrate to oxygen. We detected 2.5-3.0-fold higher oxygen consumption in *ppr40-1* mutant mitochondria compared to wild type. Furthermore, we observed that cytochrome c oxidase activity was about twice as high in the *ppr40-1* mutant than in wild type, and the ascorbate consumption was 25% higher in roots and 50% higher in cell culture of the *ppr40-1* mutant compared to wild type. These results showed that Complex IV is not only fully functional, but it works at a higher rate and ascorbate could at least partially bypass the defect of electron transport in the *ppr40-1*. Reduced respiration

rates in the *ppr40-1* mutant suggest that PPR40 protein is essential for the electron transport through Complex III.

In mitochondria Complex III was shown to be the principal source of reactive oxygen species (ROS), and inhibition of cytochrome c oxidase activity increases ROS generation and oxidative damage (Chen et al., 2003). In plants mitochondrial ROS production can be reduced by non-phosphorylating respiratory pathways, which includes alternative oxidases (AOX). AOX activity bypasses Complex III and Complex IV of the electron transport chain. Our measurements showed that the AOX activity was 60-70% higher in the *ppr40-1* mutant compared to wild type mitochondria. We also compared the stress-responsive *AOX1d* transcript levels in *ppr40-1* and wild type plants. In the *ppr40-1* mutant elevated transcript level of the *AOX1d* gene has been found, which clearly indicates activation of the non-phosphorylating respiratory pathways as consequence of the impeded Complex III function.

Complex I and Complex III are considered to be the main sources of ROS generated in mitochondria during oxidative respiration (Chen et al., 2003). Therefore, we have tested ROS accumulation and the effect of oxidative damage in the *ppr40-1* mutant. Comparison of hydrogen peroxide production in mitochondria isolated from either roots or cultured cells of *ppr40-1* mutant and wild type indicated 30% higher H₂O₂ levels in *ppr40-1* mitochondria. Lipid peroxidation is a direct consequence of ROS damage and is therefore considered as major indication for ROS accumulation. We observed that the ratio of oxidized lipids was 20 to 25% higher in leaves of the *ppr40-1* mutant compared to wild type plants. Superoxide radicals are known to be generated by Complex III misfunction during stress and represent the most damaging ROS species. Superoxide radicals are converted to H₂O₂ by mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase. We found that the SOD activity was 15% higher in leaves of the *ppr40-1* mutant compared to wild type plants. However, this difference was more pronounced when MnSOD activity was measured in isolated mitochondria, which indicated 40% higher activity in *ppr40-1* than wild type. The observed increase of mitochondrial MnSOD activity therefore suggested enhanced generation of superoxide radicals and subsequent hydrogen peroxide accumulation in the *ppr40-1* mutant, which was in fact detected in our previous assays. Enhanced H₂O₂ levels and lipid peroxidation in the *ppr40-1* mutant suggest that AOX activation cannot compensate completely the disturbed cytochrome c oxidase activity. In fact, the *ppr40-1* mutant showed increased sensitivity to externally added hydrogen peroxide or the ROS generating herbicide, paraquat. The detoxification system of *ppr40-1* is probably overwhelmed by ROS, which was generated in the damaged mitochondrial electron transport and detoxification is therefore insufficient to

reduce effectively the increased ROS levels during stress conditions. In the *ppr40-1* mutant mitochondria with reduced respiration can generate a permanent stress condition, with constitutive stress signals activating metabolic defences. Therefore, enhanced sensitivity of the *ppr40-1* mutant to high salinity probably also reflects an enhanced ROS damage during stress.

11. Publikációs lista

A dolgozat alapját képező publikációk:

Szabados L, Kovács I, Ábrahám E, Oberschall A, Nagy R, **Zsigmond L**, Krasovskaja I, Kerekes I, Amit Ben-Haim, Koncz Cs (2000) Arabidopsis genome project in Hungary: generating T-DNA tagged Arabidopsis genes. FEPPS 2000, *Plant Physiol. Biochem.* 38: S10-03L (absztrakt)

Szabados L, Kovács I, Oberschall A, Ábrahám E, Kerekes I, **Zsigmond L**, Nagy R, Alvarado M, Krasovskaja I, Gál M, Berente A, Rédei GP, Haim AB, Koncz C (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the Arabidopsis genome. *Plant J* 32: 233-242

Zsigmond L (2004) Characterisation of the ABA sensitivity influencing Arabidopsis PPR gene. *Acta Biol Szeged* 48:93

Zsigmond L, Rigó G, Szarka A, Székely Gy, Ötvös K, Darula Zs, Medzihradszky KF, Koncz Cs, Koncz Zs, and Szabados L (2008) Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* (közlés alatt, Epub: 2008. február 27.)

Társszerzős publikációk:

Alvarado MC, **Zsigmond L**, Kovács I, Cséplő A, Koncz C, Szabados L (2004) Gene trapping with firefly luciferase in Arabidopsis. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiol* 134: 18-27

Székely Gy, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigó G, **Zsigmond L**, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz Cs, Szabados L (2008) Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* perform distinct regulatory functions in proline biosynthesis. *Plant J* 53: 11-28

12. Függelékek

Körülmények	Csírázási válasz	Növekedési válasz
1/2 MS, fény	lassabb	csökkent méret
1/2MS, sötét	mint a Col-0	mint a Col-0
1/2MS, sötét, etilén (ethephon 10mg/l)	mint a Col-0	mint a Col-0
Glükóz (50 – 100 – 200 - 300 mM)	érzékeny	érzékeny
Mannitol (50 – 100 – 200 - 300 mM)	érzékeny	na
Szacharóz (2%, 4%, 6%, 8%)	érzékeny	na
KCl (30 – 60 – 90 – 120 – 150 mM)	mint a Col-0	na
NaCl (50 – 100 – 150 – 200 mM)	érzékeny	érzékeny
LiCl (5 – 10 – 15 – 20 – 30 mM)	kissé toleráns	na
PEG (25 – 30 – 35 – 40 %)	mint a Col-0	mint a Col-0
H ₂ O ₂ (5 – 10 – 15 – 20 mM)	mint a Col-0	érzékeny
Paraquat (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 µM)	mint a Col-0	érzékeny
Hideg (4°C, 14°C)	lassabb	lassabb növekedés
Metilglioxál (2 – 2,5 – 3 – 3,5 mM)	toleráns	toleráns
Aszkordinsav (1 – 2 – 4 mM)	mint a Col-0	mint a Col-0
Aszkorbinsav + NaCl	mint a Col-0	mint a Col-0
ABS (0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 µM)	érzékeny	érzékeny
NES (0,5 – 1,0 – 2,5 – 5 µM)	mint a Col-0	mint a Col-0
2,4-D (0.05 mg/l), 9-iP (1.0 mg/l)	mint a Col-0	mint a Col-0
2,4-D (0.5 mg/l) 9-iP (0.1 mg/l)	mint a Col-0	mint a Col-0
2,4-D (0.5 mg/l), kinetin (0,2 mg/l)	mint a Col-0	mint a Col-0
2,4-D (5 mg/l), kinetin (0,2 mg/l)	mint a Col-0	mint a Col-0

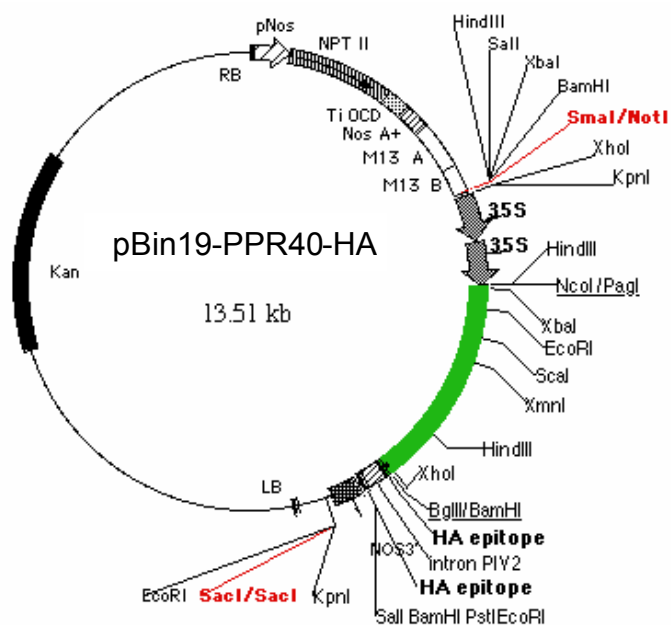
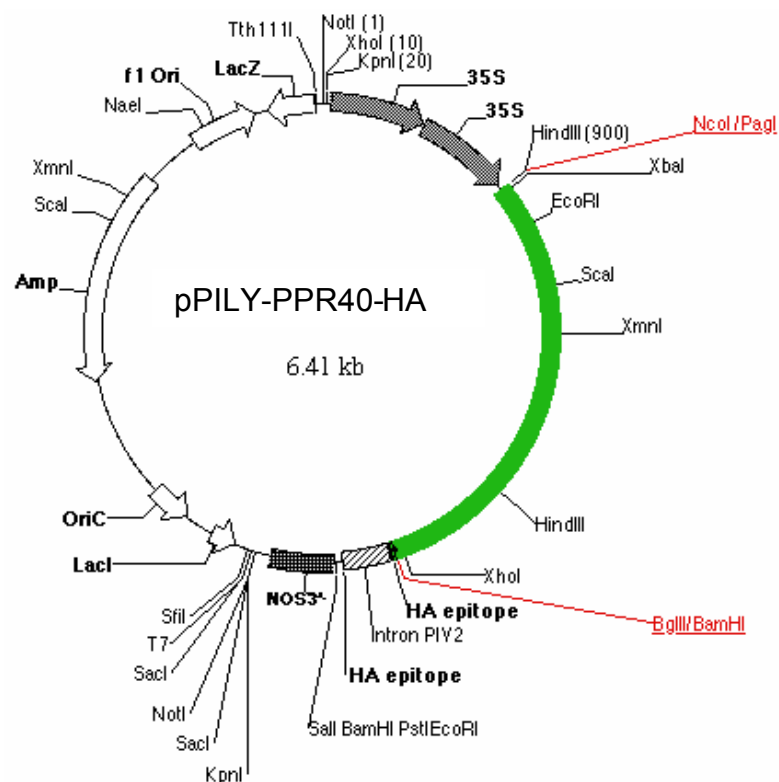
12.1. táblázat A *ppr40-1* mutáns fenotípusának vizsgálata.

Csírázási és növekedési körülmények.

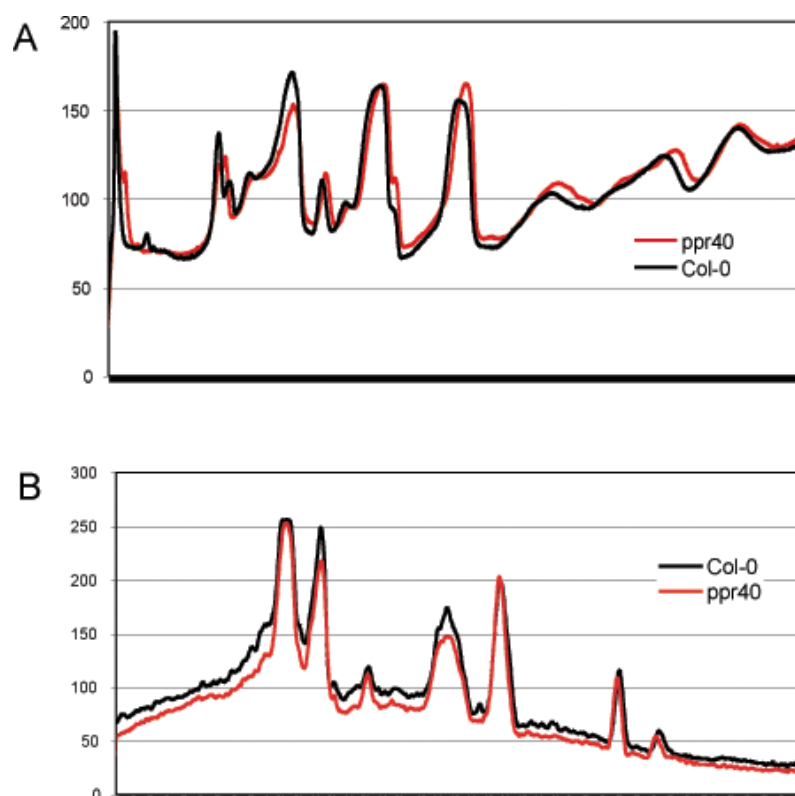
Név	Szekvencia (5'→ 3')	Gén, referencia
PPR40-F	CACACCATGGGAGGCTTTGCTTCTTCAGC	At3g16890
PPR40-R3	TCATGGATCCTGAGGCTGACACGGTTTCTC	At3g16890
PPR40-R1	GGTTTACGGATGTGGAAGCG	At3g16890
PPR40 rt-F	CCTGCGATTTTACCTCTGGG	At3g16890
PPR40 rt-R (R2)	ATCCTTAGCGTAAACCGGGTC	At3g16890
PPR40 Rbr-F	CGCTTCCACATCCGTAAACCCTAA	At3g16890
PPR40 Lbl-R	CTCAATACCCCATTTCCAACATCTCC	At3g16890
LB31	CTTTCGCCTATAAATACGACGGATCG	T-DNS, Szabados és mtsai., 2002
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA (SALK LB)
ATGLX1-F	CAGTCAAAGGTGGAGGCAGT	At1g11840
ATGLX1-R	CAGAAAGGTTTCAGGAGTTGGA	At1g11840
At1g15380-F	TCCCGATACGAAGACCTGAA	At1g15380
At1g15380-R	CTCCACTACTCCCATACTCTCACAC	At1g15380
At1g80160-F	AGAGTATGTGAGAGCAGTGGTTGA	At1g80160
At1g80160-R	GGTCGTGGAAGAAGAGTTGGT	At1g80160
GLX2-1-F	ACACAGCAGGCAATCTCAAGT	At2g43430
GLX2-1-R	ATGGGTTACACGCTTTCTCAA	At2g43430
GLX2-2-F	AACGGAAAAGAAGGAGAAAACC	At3g10850
GLX2-2-R	GCCAGAGTCACACACAACGA	At3g10850
Aox1d-F	TACCGCACTCTTCGAC	At1g32350, Thirkettle-Watts és mtsai., 2003
Aox1d-R	GGCTGGTTATTCCCACT	At1g32350, Thirkettle-Watts és mtsai., 2003
ADH1-F	GAATCGCTGGTGCTTCTAGG	At1g77120, Liu és mtsai., 2005
ADH1-R	CTCAGCGATCACCTGTTGAA	At1g77120, Liu és mtsai., 2005
RAB18- F	CAGCAGCAGTATGACGAGTA	At5g66400, Pandey és Assmann, 2004
RAB18- R	CAGTTCCAAAGCCTTCAGTC	At5g66400, Pandey és Assmann, 2004
RD29A-F	ATCACTTGGCTCCACTGTTGTTC	At5g52310, Pandey és Assmann, 2004
RD29A-R	ACAAAACACACATAAACATCCAAAGT	At5g52310, Pandey és Assmann, 2004
DREB1B-F	TCCAAAGCGACACGTCACCATCTC	At4g25490, Czechowski és mtsai., 2004
DREB1B-R	CCGCCGTCTGTTCAATGGAATCAT	At4g25490, Czechowski és mtsai., 2004
DREB2B-F	TCGAGATGAAGCGGATGCAAATCA	At3g11020, Czechowski és mtsai., 2004
DREB2B-R	TGAATGAACCTGGTCCCCATCAGA	At3g11020, Czechowski és mtsai., 2004
AtMYB2-F	GGCAATAGGTGGTCGAAGATTGCG	At2g47190, Czechowski és mtsai., 2004
AtMYB2-R	GTGTTTGGCTTGCTTTTGGACTCG	At2g47190, Czechowski és mtsai., 2004
ABI5-F	ATTGGCGGAGTTGGAGAGGAAGAG	At2g36270, Czechowski és mtsai., 2004
ABI5-R	TCGTTGTGCCCTTGACTTCAAA	At2g36270, Czechowski és mtsai., 2004
ABF3-F	AAATCAGCTTCTGGAGCCTCTGC	At4g34000, Czechowski és mtsai., 2004
ABF3-R	CAAGCATTGCCTTTTGCATCCCAT	At4g34000, Czechowski és mtsai., 2004
RD22-F	GCGATTGCGGCTGATTTAAC	At5g25610
RD22-R	TGGGAATGGGAGTGTTTGGT	At5g25610
Act2/8-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	At3g18780, An és mtsai., 1996
Act2/8-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	At3g18780, An és mtsai., 1996
GAPDH-2-F	AATGGAAAATTGACCGGAATGT	At1g13440, Czechowski és mtsai., 2005
GAPDH-2-R	CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA	At1g13440, Czechowski és mtsai., 2005
CYC1-1-F	TGGGCATCAAGTTTATCAGCAAGTCT	At3g27240
CYC1-1-R	GCATATGGCTGAGGAAACCGG	At3g27240
CYC1-2-F	GAACCTCTGCAACAGAAGCACAG	At5g40810
CYC1-2-R	AGTCTCCTGTAATACGCAGCTTGAAG	At5g40810
MPPa-1-F	AGGCTATTGGAGGCAACACATCC	At1g51980
MPPa-1-R	CTATCTCTACCTTCATCTTCCGT	At1g51980
MPPa-2-F	AGCTGGCTAAGTGGAGGCTAC	At3g16480
MPPa-2-R	GGATTCGGAGACATCTCAGTGGC	At3g16480

Név	Szekvencia (5'→ 3')	Gén, referencia
MPPb-F	GGATTCGGAGACATCTCAGTGGC	At3g02090
MPPb-R	CCACCACCAACATTTTTGTTCACG	At3g02090
UCRY-F	CCCCAACTGAAGAGAAGTGAGA	At2g40765
UCRY-R	AGAAAGCCCCAGAAAAGAACC	At2g40765
UCR1-1-F	TCCGGCATGTTAGAGCAAGA	At5g13430
UCR1-1-R	GCGATGGATAAACGAAGATTGA	At5g13430
UCR1-2-F	ATTAAAGGAATATCCGCAAAGAAGA	At5g13440
UCR1-2-R	CAAAGCAAGAACACACAATCGTAA	At5g13440
UCRQ-1-F	AGGAACAGGAGAAGCTTGAGCA	At3g10860
UCRQ-1-R	CAAGAGTCATTGTTCATGAAACCCAAACA	At3g10860
UCRQ-2-F	GGAGATTTGGTCGTCGAAAATGGG	At5g05370
UCRQ-2-R	GACAGGAGCGACGAGGAGAATAG	At5g05370
QCR6-1-F	GCTCTGCTTCTTGTTTTGTTT	At1g15120
QCR6-1-R	TGATTTGTTTGACGCATTGTCT	At1g15120
QCR6-2-F	AGTGTGTGAGTGCTGTTTTCTGT	At2g01090
QCR6-2-R	GGAGCCCGTGTTAGTTATGGTT	At2g01090
QCR7-1-F	AGGTCGTTGATGCTCGTAACC	At4g32470
QCR7-1-R	CTCGTTCCTTGCTTCCCTCT	At4g32470
QCR7-2-F	TCTGAAGAGAGGCGTGTAACCT	At5g25450
QCR7-2-R	GCAAGCTCATAAACTGCCTTG	At5g25450
QCR9-F	GATACCTGAAAACAACCAATCAATC	At3g52730
QCR9-R	CGTAATCCACAGCCCGTTC	At3g52730
COB-2-F	CCCCCTCCATCCTTCAAAA	At2g07727
COB-2-R	CATTTCTCTTTCCTATCGTGACAAC	At2g07727
cob-F	CGACCGATTACCAAGGAA	At2g07727/AtMg00220
cob-R	GCAAAGAACAAGAAGAAAACCAAA	At2g07727/AtMg00220
cob-F2	TATCCAACCCCGAGCAATC	At2g07727/AtMg00220
cob-F3	GGGGGAACAAGAGTTGTC	AtMg00220
cob-R3	GATTGGTGTGAGAATTTTCAC	AtMg00220

12.2. táblázat A dolgozatban leírt oligonukleotidok listája



12.1. ábra *Agrobacterium*-közvetített növény transzformációkban használt plazmid konstrukciók



12.2. ábra Mitokondriális komplexek és a III komplex alegységének ImageJ program segítségével történő képelemzése BN/SDS PAGE elválasztás után

A: BN-PAGE elválasztás (első dimenzió)

B: SDS-PAGE elválasztás (második dimenzió)